



Regulace morfogeneze rostlinných buněk a orgánů

Řešitelská pracoviště:

Ústav experimentální botaniky AV ČR - příjemce-koordinátor Zažímalová Eva, Doc. RNDr. CSc. - řešitelka koordinátorka	UEB
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta - příjemce Katedra fyziologie rostlin, Katedra genetiky a mikrobiologie. Opatrný Zdeněk, Prof. RNDr. CSc. - řešitel	UK
Masarykova univerzita v Brně - příjemce Přírodovědecká fakulta, Oddělení funkční genomiky a proteomiky. Hejátko Jan, RNDr. Ph.D. - řešitel	MU
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze - příjemce Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie. Novotná Zuzana, Dr. Ing. - řešitelka	VSCHT
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně - příjemce Agronomická fakulta. Brzobohatý Břetislav, Doc. RNDr. CSc. - řešitel	MZLU
Ústav fotoniky a elektroniky AV ČR - příjemce Sekce fotoniky. Kašík Ivan, Dr. Ing. - řešitel	UFE

Cíl projektu: Navrhnout model regulace morfogeneze rostlin na základě propojení funkce fytohormonů, signálních drah a jednotlivých buněčných struktur (plasmatická membrána, endomembránový systém, cytoskelet), a vyvinout metodu pro měření intracelulárního pH.

Anotace projektu

Základem růstu a morfogeneze rostlin jsou striktně časově a prostorově regulované procesy buněčného dělení, růstu, a tvarových změn (buněčná morfogeneze) a posléze proces diferenciace. Tyto procesy podléhají složitému systému vzájemně koordinovaných regulací; jejich základem je příjem a přenos signálů, kde klíčovou roli hrají signály hormonální povahy. Většina z nich je přijímána na plasmatické membráně a signál je dále přenášen speciálními přenosovými drahami, které jsou propojeny s dynamikou buněčných struktur. Projekt je zaměřen na studium funkce a dynamiky proteinů podílejících se na regulaci morfogeneze rostlinných buněk a na charakterizaci buněčných procesů, které determinují distribuci jak těchto proteinů tak i hormonálních signálů.

Pro řešení problematiky Centra byly v návrhu projektu zformulovány tyto dílčí cíle a navrženy přibližné termíny jejich dosažení:

V001: Zavést fluorescenční kvantitativní metody pro sledování membránových dějů u rostlinných buněk. Připravit transgenní linie nesoucí geny vztahující se k hormonálním signálům a geny pro komponenty cytoskeletu a transportu váčků - 31.12.2007

V002: Charakterizovat molekulární komponenty polárního transportu auxinů a jejich dynamiku na plasmatické membráně - 31.12.2009

V003: Charakterizovat proteiny, které u rostlin interagují s transportem buněčných váčků, a jejich úlohu v řízení transportu buněčných váčků - 31.12.2009

V004: Charakterizovat struktury cytoskeletu a jejich úlohu v dílčích morfogenních procesech - 31.12.2009

V005: Charakterizovat úlohu vybraných signálních drah se zřetelem na regulaci morfogeneze rostlinné buňky - 31.12.2009

V006: Zavést a optimalizovat optické metody lokální detekce fyzikálně-chemických veličin s velmi jemným prostorovým rozložením pro studium buněčných struktur - 31.12.2009

V007: Poznat a charakterizovat mechanismy homeostáze fytohormonů auxinového a cytokininového typu ve vztahu k regulaci morfogeneze - 31.12.2009

V008: Integrovat všechny poznatky získané při řešení různých aspektů projektu a zkonstruovat model regulace morfogeneze rostlinné buňky a orgánů - 31.12.2010

Stručné informace o postupu prací v roce 2007 jsou přiřazeny níže k příslušným dílčím cílům spolu s informací, která z partnerských institucí (případně ve spolupráci se zahraničním pracovištěm - zkratka "zahr.") je za příslušný dílčí výsledek zodpovědná (slouží pouze pro interní informaci Rady centra). Rozdělení řešené problematiky do dílčích cílů je čistě formální a mnohé oblasti výzkumu spadají pod dva i více dílčích cílů (v textu je vyznačeno).

Dílčí cíl V001 je čistě metodický a zaměřený také na přípravu experimentálního materiálu. Postup prací v rámci tohoto dílčího cíle je zčásti včleněn i do dalších dílčích cílů, které odrážejí konkrétní biologickou problematiku.

"Nebiologický" dílčí cíl V006 byl pro větší přehlednost přesunut na konec věcné části zprávy - za dílčí cíl V007.

Poslední dílčí cíl V008 je shrnutím a vyhodnocením problematiky řešené v rámci celého projektu, proto bude plněn až v posledních letech řešení.

Zpráva o průběhu prací na projektu LC 06034 za rok 2007

1. Nákup investic z prostředků Centra v roce 2007

MU: Z prostředků centra byla zakoupena část vybavení hmotnostního spektrometru HCTultra™ PTM Discovery System (670.155,- Kč). Nákup této investice by měl zásadním způsobem zvýšit konkurenceschopnost MU při analýzách proteomu (zvýšení citlivosti oproti současnému vybavení až o řád). Zbylé prostředky (76.845,- Kč) byly použity na uhrazení části nákupní ceny třepačky pro kultivaci rostlinných protoplastů. (Změna specifikace.)

UFE: Systém charakterizace fluorescence, rozpočet 598 tis. Kč, cena 604 tis. Kč. (Změna specifikace: namísto „Fibre optic spectrometer NIR256-2,1 + řídicí jednotka“ byl pořízen celý systém, zahrnující v dané ceně i světelný zdroj.)

Všechny změny byly poskytovatelem schváleny.

2. Průběh prací v roce 2007 a plány na rok 2008

VOO1 Zavést fluorescenční kvantitativní metody pro sledování membránových dějů u rostlinných buněk. Připravit transgenní linie nesoucí geny vztahující se k hormonálním signálům a geny pro komponenty cytoskeletu a transportu váčků

Ve spolupráci s Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského (Martin Hof, J. Humpolíčková, Biospektroskopická laboratoř) byla provedena měření na konfokálním mikroskopu pracujícím v časovém rozlišení. Byla zavedena metoda měření anisotropie fluorescence GFP-značených proteinů v rostlinných buňkách. Anisotropie fluorescence je v těchto podmínkách ovlivněna přenosem energie mezi molekulami stejného typu proteinu (homo-FRET) a vypovídá o tom, zda spolu dané typy proteinů tvoří nebo netvoří oligomery. Ve spojení s konfokálním mikroskopem pak metoda dovoluje určit oblasti buněk, kde k oligomerizaci daného proteinu dochází a kde se protein vyskytuje jako monomer. Měření byla provedena na tkáňové kultuře BY-2 u proteinu PIN1, a dále na kořenových špičkách *Arabidopsis thaliana* a proteinech PIN1, PIN2, PIN3, PIP2, BRI1, MAP65 a tubulinu. Dosavadní výsledky ukazují, že metoda je vhodná pro *in vivo* pozorování různé stechiometrie proteinových komplexů (odpovídající různé míře homo-FRETu, a tedy velikosti anisotropie). Jednotlivé zkoumané proteiny fúzané s GFP se zásadně liší co do pozorovaného rozložení anisotropie fluorescence ve sledovaných buňkách. Vypovídá to o tendenci těchto proteinů spontánně vytvářet oligomery v různých částech buněčné membrány (vzhledem k asymetrii kořene) nebo cytoskeletu. Ve většině případů rozložení anisotropie v buňce jednoznačně koreluje se známou funkcí a lokalizací těchto proteinů (například polymerní tubulin - nízká anisotropie, monomerní - vysoká anisotropie). V některých případech membránových proteinů (PIN1 a PIN2) se potýkáme s určitými artefakty vyvolanými nenáhodnou orientací molekul GFP vůči rovině plazmatické membrány. Tyto potíže však plánujeme řešit postupnou změnou polarizace excitačního záření a postupným vybělováním sledované oblasti se současným sledování změny anisotropie fluorescence v čase. Oba přístupy by měly umožnit spolehlivé hodnocení dat v anisotropním prostředí blízko plazmatické membrány. Tento velmi moderní přístup nebyl zatím nikde ve světě použit na rostlinných buňkách, proto připravujeme na rok 2008 metodickou publikaci ukazující využitelnost této metody u rostlin. (UK+UEB)

Příprava transgenních linií: Již v předchozím roce byla vytvořena databáze vektorů pro N- a C- terminální translační fúze vybraných rostlinných proteinů s markerovými fluorescenčními proteiny (GFP, mRFP1). Cílem byla a je příprava a následná možnost studia dvojité transformovaných buněk, exprimujících cytoskeletální podjednotky nebo asociované proteiny - jednak v pletivech rostlinných orgánů (viz výše resp. dále), jednak v modelových systémech buněčných linií (zejména „rodiny“ BY-2). Alternativu k zelenému značení GFP představuje červeně fluoreskující protein mCherry. V průběhu roku byl využit pro vytvoření další řady vektorů, zejména obou druhů fúzí s fimbrinem. Konstrukty byly ověřovány nejprve v infiltračních pokusech na pokožkových buňkách tabáku. V současnosti probíhají transformační pokusy s buněčnými liniemi. (UK+UEB)

Plány na rok 2008:

- Pokračovat ve studiu proteinů spojených s transportem auxinů a využít přitom metod fluorescenční spektroskopie (homo-FRET ovlivňující anisotropii fluorescence GFP-značených proteinů a studium difúze membránových proteinů pomocí fluorescenční korelační spektroskopie FCS) (UK)
- Testovat možné oligomerizace přenašečových molekul v membráně v různých pletivech a vývojových fázích růstu *Arabidopsis thaliana* (UK+UEB)
- Připravit konstrukty pro expresi fúzních GFP proteinů TANGLED, CLASP, HSP90, mCherry a fimbrinu v transgenních buněčných subliniích BY-2 (UK)
- Optimalizovat biolistickou techniku transientní i stabilní transformace a následné selekce transgenních buněčných sublinií BY-2 (UK)
- Připravit a charakterizovat vybrané transgenní linie (UK + UEB)
- Zlepšit protokol přípravy buněčných linií *Arabidopsis* (UK+UEB)

V souladu s časovým rozpisem řešení jednotlivých dílčích cílů bude tato problematika postupně převedena z tohoto čistě metodického cíle pod konkrétní dílčí cíle, kde najde uplatnění.

VO02 Charakterizovat molekulární komponenty polárního transportu auxinů a jejich dynamiku na plasmatické membráně

Byla provedena první předběžná evoluční analýza proteinové rodiny PIN ve vztahu k vývoji axiality a polaroty u rostlin. Studie předpokládané struktury proteinů PIN předpověděla několik fosforylačních a glykosylačních domén především v centrální hydrofilní smyčce a jeden motiv pro endocytosu závislou na klathrinu, lokalizovaný v těsném sousedství 6. transmembránové domény (Zažímalová et al., Cell. Mol. Life Sci. 2007). (UEB)

Z *Prunus avium* byl izolován gen *PaLAX1*; tento gen i jeho proteinový produkt jsou sekvenčně velmi podobné genu *AUX1* z *Arabidopsis*, jehož produkt je kandidátem na přenašeč auxinu do buňky. Připravili a charakterizovali jsme transgenní rostliny tabáku a *Arabidopsis*, overexprimující gen *PaLAX1*. Overexprese tohoto genu pod silnými konstitutivními promotory vedla ke zvýšení interních hladin nativního auxinu, ke zvýšené schopnosti auxin do buněk přijímat a u homozygotů k záchraně mutantního fenotypu rostlin *aux1*, které nemají funkční přenašeč *AUX1*. Tato data jsou významnými důkazy svědčícími pro přímou přenašečovou funkci proteinů rodiny *AUX/LAX* (Hoyerová et al., Plant Physiology, v tisku). (UEB)

Byly připraveny transgenní buněčné linie tabáku nesoucí geny *AtPIN5* a *AtPGP19* a byly biochemicky, cytologicky i fyziologicky charakterizovány. Byla potvrzena funkce *PGP19* jako přenašeče auxinu z buňky a byla zjištěna překvapivá lokalizace *PIN5* na endomembránách (výsledky jsou připravovány k publikaci). (UEB+zahr.)

Hypotetický protein vázající nekompetitivní inhibitory polárního transportu auxinu nebyl prozatím izolován. Na základě předběžných výsledků však byla pozornost věnována analýze mutantů *Arabidopsis* v kandidátních proteinech a tyto mutanty byly testovány na citlivost k fytotropinům pomocí několika biotestů. Též se započalo s křížením těchto mutantů do markerových linií (proteiny *PIN1,2,3* v GFP-fúzi, *DR5rev::GFP* a *DR5::GUS*). (UEB+MU)

Bylo charakterizováno endocytotické cyklování přenašečů auxinu z buněk (proteiny PIN) v buňkách BY-2. Bylo zjištěno, že tento proces je u tabáku zajišťován zřejmě jinou skupinou faktorů, než je tomu u Arabidopsis. Zejména odlišná je citlivost k inhibitorům typu BFA. Zcela nový účinek fluorescenčních styrylových látek běžně využívaných při studiu endocytózy byl objeven u buněk BY-2 a též v rostlinných pletivech. Tyto látky způsobují rychlou relokaci membránových proteinů do endosomálního prostoru buněk. Pomocí inhibitoru endocytózy (dynasore) bylo možno tento proces pozastavit, což naznačuje, že se jedná o aktivní endocytózu stimulovanou masivní inkorporací styrylového markeru do membrány. Publikace bude zaslána do tisku v první polovině roku 2008. (UEB)

Pokračuje klonování tabákových homologů přenašečových molekul a příprava dalších spektrálních variant fúzních proteinů. (UEB+UK)

Role polárního transportu auxinu v uvolňování pupenů z apikální dominance: Na studium expresních profilů genů PIN1 a AUX1 a imunolokalizaci proteinu PIN1 navazovalo studium exportu auxinu z pupenu, které potvrdilo neexistenci polárního exportu auxinu z inhibovaných pupenů a rychlé ustavení polárního transportu auxinu po uvolnění z inhibice (1-2 hodiny). Studium exprese PIN1 a AUX1 ve stonku nad a pod pupenem bylo zjištěno několikanásobné zvýšení exprese obou genů pod pupenem po jeho uvolnění z inhibice. (Publikace pro impaktovaný časopis je ve stádiu posledních úprav a dokončování obrázků před odesláním do tisku). V rámci studia inhibice pupenů vyrůstajícím dominantním pupenem bylo zjištěno, že po 4-5 dnech po dekapitaci v době, kdy inhibovaný pupen již 24 hodin nevykazuje přírůsteky, dochází také k zastavení exportu auxinu z těchto pupenů (patří též do dílčího úkolu V007). (MZLU)

Plány na rok 2008:

- Izolace a charakterizace hypotetického proteinu vázajícího nekompetitivní inhibitory polárního transportu auxinů - pokračování (UEB)
- Charakterizace endocytotického kroku konstitutivního cyklování proteinů PIN v buněčných kulturách tabáku a Arabidopsis - pokračování (UEB+UK+zahr.)
- Příprava různých transgenních linií tabáku a Arabidopsis, nesoucích geny pro přenašeče auxinů do buňky a gen pro možný receptor auxinů *AtABPI* pod indukovatelnými promotory, jejich charakterizace - pokračování (spadá částečně také pod dílčí cíl V005) (UEB)
- Klonování tabákových homologů přenašečových molekul a příprava dalších spektrálních variant fúzních proteinů - pokračování (UEB)
- Studium procesů spojených s inhibicí axilárních pupenů po obnově apikální dominance, především změn exprese genů spojených s apikální dominancí a transportem auxinu. Rozšíření studia z modelové rostliny hrachu také na Arabidopsis - pokračování (MZLU)

V003 Charakterizovat proteiny, které u rostlin interagují s transportem buněčných váčků, a jejich úlohu v řízení transportu buněčných váčků

Dále postoupila práce na charakterizaci komplexu exocyst - identifikace podjednotek byla doplněna proteomickou analýzou, která vedle několika známých podjednotek odhalila také podjednotku Sec10, proti které dosud nemáme

protilátku. Byla provedena kolokalizace podjednotek Sec8, Sec6 a Exo70a1 ve špičkách rostoucích pylových láček - téměř úplný překryv signálu odpovídá našim biochemickým analýzám prokazujícím existenci komplexu. (UEB+VSCHT) Genetická analýza inserčních mutantů *Arabidopsis* s poškozenými lokusy kódujícími podjednotky exocystu Sec6 a Exo84b ukázala, že trpí identickou poruchou ve vývoji pylu jako dříve publikovaný mutant *Arabidopsis* v podjednotce Sec8. (UEB)

Při studiu fenotypů mutantů *exo70a1* kultivovaného za různých podmínek byly pozorovány nové fenotypy (zvl. ve vývoji hypokotylu a kořenů), které dále podporují hypotézu o vztahu exocystu k polárnímu transportu auxinu. Stejným směrem ukazují také výsledky sledování lokalizace proteinů PIN u mutantů exocystu a sledování transportu radioaktivně značeného auxinu. Ke transkriptomické analýze ve fy. Affymetrix byla odeslána RNA z mutantů Exo70a1. (UEB+UK+MU+zahr.)

Pokračovala charakterizace dříve získaných interaktorů podjednotek exocystu, zejména tří klonů získaných v předchozím roce, které kódují vzájemně příbuzné geny z dosud necharakterizované rodiny. Pro tyto geny byli získáni inserční mutanti *Arabidopsis*; probíhá charakterizace jejich fenotypu. Probíhá rovněž další kolo screeningu dvouhybridních knihoven. Byl rovněž získán inserční mutant v genu kódujícím podjednotku exocystu Sec8, jehož počáteční charakterizace naznačuje specifickou roli exocystu ve vývoji semenných obalů. (UK+UEB+zahr.)

Po stránce struktury a genové exprese byla charakterizována rodina sekretovaných hybridních proteinů bohatých prolinem u bramboru a modelové rostliny *Arabidopsis*. (Dvořáková et al. *BMC Genomics* 2007) (UK)

Plány na rok 2008:

- Budou charakterizovány další potenciální interaktory exocystu získané z dvouhybridního screeningu (UK)
- V případě exocystu se zaměříme na bližší charakterizaci souvislostí s auxinem a vývojovými pochody v kořeni a hypokotylu klíčnicích rostlin, ale také dalších orgánů a vývojových stádií, zvl. semenných obalů (UEB+UK)
- Bude podrobněji charakterizována možná role exocystu a interagujících proteinů ve vývoji semenných obalů (UK)
- Bude dokončen rukopis publikace dokazující existenci exocystu jako funkční entity u rostlin (UEB+UK+zahr.)
- Bude provedena podrobná analýza "fytohormonů" u mutantů *Arabidopsis exo70 a1*. Výsledky této analýzy společně s očekávanými výsledky transkriptomické analýzy by mohly přinést zásadní podněty pro rozhodování, kam nasměrovat naše analýzy v dalším období (UEB)

VO04 Charakterizovat struktury cytoskeletu a jejich úlohu v dílčích morfogenních procesech

Podle plánu jsme Gateway systémem vyklonovali z cDNA *Arabidopsis* geny pro vybrané RanGTPázy (RanBP, TPX2) a Aurora kinázu, vhodné pro studium buněčného cyklu vyšších rostlin. Připravili jsme konstrukty s N- i C-terminálními fúzelemi genů s GFP, RFP a tagovanými verzemi genů, a konstrukty pro expresi dsRNA. (UEB)

Připravili jsme pro konstrukty s GFP-fúzelemi transientní exprese RanGTPázových genů technikou nastřelování do pokožky cibule (particle bombardment), infiltrací transformovaných Agrobakterií do listů tabáku *N. benthamiana*, a transientní exprese GFP a RFP variant v buněčných liniích *Arabidopsis* (Columbia) a tabáku (BY-2), i v buněčných

liniích s GFP-značenými mikrotubuly, mikrofilamenty a membránovými kompartmenty. Snažíme se získat stabilně exprimující buněčné linie k dalším studiím. Zatím se podařilo odvodit stabilní buněčnou linii nesoucí GFP-verzi Golgi aparátu. První výsledky naznačily lokalizaci exprese RanGTPázových genů na membránových kompartmentech buněk v okolí jader a v cytoplazmě. S přípravou transienční exprese u listů *Arabidopsis* jsme neuspěli. Metodou floral deep (infiltrace do květenství) byly transformovány rostliny *Arabidopsis* vybranými geny RanGTPáz a Aurora kináz včetně některých domén a začaly se provádět selekce semenného potomstva T1 generace. Rostliny *Arabidopsis* byly transformovány GFP-, RFP- a RNAi-variantami genů. Bylo využito různých markerových linií *Arabidopsis* nesoucích GFP-značené mikrotubuly, mikrofilamenta a další kompartmenty buněk. (UEB)

Dokončili jsme experimenty objasňující inhibiční efekt anticytokininů a jejich vliv na buněčný cyklus a cytoskelet u vyšších rostlin. Efekt inhibitoru se projevil zablokováním většiny buněk v G2/M fázi buněčného cyklu, abnormálním uspořádáním mikrotubulů, později kolapsem mikrotubulárního cytoskeletu a indukci apoptózy. Anticytokininy a inhibitory buněčného cyklu budou dále využívány v našich experimentech objasňujících lokalizace RanGTPáz, Aurora kináz a TPX2 (spadá také do dílčího ocíle V005). (UEB)

Testovali jsme hypotézu, že ionty Al^{3+} rigidizují membránu rostlinných buněk v koncentracích, které ovlivňují fyziologické funkce v kořeni. Pro výzkum interakce Al^{3+} s membránami rostlinných buněk byly využity dvě alternativní metody sledování membránové fluidity - anisotropie fluorescence membránové sondy DPH a generalizovaná polarizace fluorescenční membránové sondy Laurdan. Druhá metoda vykazovala větší citlivost při stanovení efektu Al^{3+} . Oběma metodami se podařilo prokázat rigidizační účinek Al^{3+} na sledované membrány. (UK)

Bioinformatickou analýzou bylo vytipováno několik dalších proteinů potenciálně se účastnících funkčních interakcí mezi mikrotubuly a aktinem. Pozornost byla věnována zejména proteinům TANGLED a CLASP. Protože však kódující sekvence tabákového proteinu TANGLED není v databázi celá, byla pomocí techniky „nested PCR“ nejprve sekvenována neznámá část genu. Dále byl vytvořen fúzní produkt s GFP (N- i C- terminální translační fúzí). V současnosti je sekvenován, funkčnost bude dále ověřena transgenozí buněk. Rostlinný homolog CLASP jsme bioinformaticky identifikovali u celé řady rostlin. Zároveň v něm byly vytipovány domény pravděpodobně přímo zodpovědné za jeho vazbu na mikrotubuly. Dle sekvencí z databází pro brambor a tabák byly navrženy vhodné primery, klonování je však zatím komplikováno především velikostí sekvence (cca 1400 AMK). Ověřuje se možnost zaklonovat fragment do pomocného vektoru, alternativu představují klonování a studium vazebné aktivity dílčích domén. (UK)

Úloha kortikálního mikrotubulárního cytoskeletu v elongaci buněk byla studována v kontextu s působením růstových retardantů na modelovou linii BY-2. Oproti očekávání nebyl zjištěn výrazný účinek na samu polaritu růstu/elongaci, ale spíše celkové ovlivnění buněčné expanze a změny/malformace buněčného tvaru. Preferenčním cílem působení retardantu ANC je buněčná stěna, jejíž aktivní turnover lze modulovat inhibicí transportu váčků - nikoliv cytoskeletálními drogami. Výsledky otevírají nové možnosti k poznání reciprokého informačního dialogu mezi buněčnou stěnou a cytoskeletem. (UK)

Funkce aktinového cytoskeletu v raných fázích somatické embryogeneze (SE) u modelové linie smrku AFO byla studována pomocí komplexu molekulárních, biochemických, cytologických i morfologických analýz. Bylo identifikováno několik aktinových genů, kodujících tvorbu různých aktinových izotypů - pravděpodobně s rozdílným zastoupením

v základních buněčných typech linie (buňky „meristematických hlav“, buňky suspenzorové). Byl charakterizován diferenciální účinek několika drog, ovlivňujících polymeraci aktinu (latrunkulin, cytochalasiny B a D), na realizaci SE. Pokusy se dokončují, výsledky připravují k publikaci. Na uvedeném modelovém materiálu byla rovněž dokončena studie zaměřená na úlohu transkripčního faktoru ABI3/VP1 v procesu somatické embryogeneze (Fischerová et al., *Plant Cell Rep.*, v tisku) (UK)

Plány na rok 2008:

- Příprava dalších nových konstruktů vybraných RanGTPáz, testování transientními expresemi v listech tabáku *N. benthamiana* a epidermis cibule a příprava stabilních transformovaných buněčných linií. Příprava dalších variant transformovaných rostlin s využitím konstruktů s GFP, RFP, RNAi a tagovaných verzí TPX2 a vybraných domén tohoto proteinu. Charakterizace selektovaného semenného potomstva TPX2, dalších RanGTPáz a Aurora kináz (UEB)
 - Optimalizace metody transformace suspenzních kultur tabáku a *Arabidopsis* pro odvození stabilních buněčných linií s příslušnou expresí a u nově připravených linií studium dynamiky a lokalizace proteinů *in vivo*. Biochemické a imunocytochemické analýzy proteinů (UEB)
 - Srovnání lokalizace námi studovaných proteinů RanGTPázové dráhy s gama tubulinem a mikrotubuly *in vivo* v transientních systémech, v buněčných liniích a rostlinách exprimujících některý RanGTPázový protein spolu s gama tubulinem, mikrotubuly či dalšími buněčnými kompartmenty. Využijeme rovněž imunodetekce proteinů v závislosti na dostupnosti protilátek (UEB)
 - Charakterizace nukleace mikrotubulů ve vztahu k RanGTPázovým drahám a dalším morfogenním procesům v buňkách vyšších rostlin na základě studia distribuce nukleačních elementů v acentrosomálních buňkách rostlin v průběhu buněčného cyklu (UEB)
 - Pokračování v měření rigidizačního účinku Al³⁺ na membrány rostlinných buněk (měření na zbývajících typech rostlinných membrán). Tato měření uzavřou soubor dat nutných k publikaci plánované na rok 2008 (UK)
 - Pokračování v identifikaci proteinů z proteinových frakcí membránových svlečků buněčných tabáku po cílené stabilizaci či destabilizaci aktinu a mikrotubulů, s cílem získat další poznatky o funkčních interakcích těchto dvou základních cytoskeletálních systémů (UK)
 - Využití (viz výše, V001) transgenních sublinií exprimujících mCherry a fimbrin ve studiu úlohy cytoskeletu v buněčné elongaci. Dokončení studia kooperací aktinového a tubulinového cytoskeletu v pletivech, u nichž byla buněčná elongace ovlivněna (narušena či indukována) působením cytoskeletálních drog (UK)
 - Dokončení pokusů objasňujících působení vybraných retardantů na cytoskelet, transport váčků a turnover buněčné stěny v kontextu s morfogenními procesy tabákové linie BY-2, publikace výsledků (UK)
-

V005 Charakterizovat úlohu vybraných signálních drah se zřetelem na regulaci morfogeneze rostlinné buňky

Cytokininy jsou rostlinné hormony regulující buněčný cyklus a mnoho různých vývojových a fyziologických procesů. Na základě strukturní podobnosti a kompetitivní inhibice účinků exogenně aplikovaných cytokininů byly různě substituované pyrrol[2,3-*d*]pyrimidiny a pyrazol[4,3-*d*]pyrimidiny označeny jako anticytokininy. V naší práci jsme přímo ověřili, zda tyto klasické anticytokininy kompetují na receptorech *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 a AHK3 a zjistili jsme, že tyto látky snižují vazbu značeného cytokininu do receptorů. Průtoková cytometrie a mikroskopická analýza však odhalila, že aplikace těchto anticytokinů vede k disorganizaci cytoskeletu a vyvolává apoptózu. Tyto změny byly porovnány s účinkem známých purinových inhibitorů CDK a pomocí biochemických studií jsme potvrdili, že klasické anticytokininy inhibují rostlinné i živočišné CDK. Rentgenostrukturní analýza krystalu lidské CDK2 vázající jeden s anticytokinů potvrdila, že tyto látky obsazují ATP-vazebné místo CDK2. Testováním cytotoxicity studovaných anticytokinů na rakovinných liniích jsme demonstrovali, že tyto látky jsou schopné zabíjet nádorové buňky se stejnou účinností jako již známé inhibitory CDK (Spíchal et al., J.Biol.Chem., 2007). **(UEB)**

Interakce mezi hormony a geny *KNOX* v časném vývoji semenáčků *Arabidopsis thaliana*: Bylo prokázáno, že působení exogenních hormonů (auxin, kyselina abscisová, cytokininy, etylén a gibereliny) nevede k ektopické expresi genu *BP*. Exprese *BP* je silně zvýšená v odpovědi na působení auxinů a to v korelaci s auxiny indukovanou iniciací meristémů postranních kořenů, v nichž je *BP* exprimován. Kyselina abscisová expresi *BP* silně snižuje. Aplikace ostatních hormonů neovlivnila expresi *BP* na úrovni celistvých semenáčků. V průběhu krátkodobého zvýšení hladin endogenních cytokininů byla pozorována orgánově specifická diferenciální regulace exprese většiny genů *KNOX*. Zpravidla se jednalo o slabou indukci jejich exprese. Výjimkou byl gen *STM*, jehož exprese v hypokotylech byla působením cytokininů potlačena. Míra potlačení exprese *STM* rostla se snižující se intenzitou světla. Analýza dlouhodobého účinku cytokininů na hladiny transkriptů *KNOXI* genů vedla k závěru, že cytokininy mají malý nebo žádný vliv na aktivitu promotorů genů *KNOXI* v hypokotylech. Ztráta funkce genu *BP* nevede ke změně citlivosti semenáčků k působení hormonů. Naproti tomu konstitutivně zvýšená míra exprese genu *BP* navodila změny v citlivosti vůči kyselině abscisové, cytokininům a etylénu. Bylo zjištěno, že indukce exprese genů indukovatelných cytokininy nastupuje v kotyledonech dříve než indukce transgenu *ipt*, který působí zvýšení hladin endogenních cytokininů, což svědčí o rychlém transportu cytokininů do kotyledonů z jiných částí semenáčků (Souček et al., J. Exp. Bot. 2007). **(MZLU)**

Role předpokládané receptorové histidinkinázy CKI1 v regulaci vnímání cytokininů u rostlin

Příprava homozygotních linií se sníženou expresí CKI1 a jejich fenotypová analýza: Během minulého roku byla prováděna analýza fenotypu transgenních rostlin se sníženou expresí genu CKI1. Výsledky byly použity pro podání patentové přihlášky a průmyslovou ochranu těchto výsledků v ČR a v Jižní Koreji. Zatím se nepodařilo tyto výsledky publikovat v recenzovaném impaktovaném časopise (rukopis byl odmítnut). V současné době je dokončována příprava upraveného rukopisu. **(MU+zahr.)**

Příprava EMS-knihovny pro detekci mutantů se změnou exprese genu CKI1 a izolace mutantních linií se změnou exprese CKI1: Bylo dokončeno prohledávání připravené mutantní knihovny a byly identifikovány linie se změnou expresního vzorce genu CKI1. U vybraných linií byla provedena předběžná genetická a fenotypová analýza a příprava mapovací populace. Identifikovali jsme několik zajímavých linií, u kterých došlo kromě změny exprese CKI1 i ke

změněm morfogeneze a v současnosti pracujeme na podrobnější genetické a molekulární charakterizaci těchto mutantů. **(MU+zahr.)**

Analýza mezi strukturou a funkcí proteinů podílejících se na přenosu cytokininového signálu

Analýza struktury a funkce přijímačové domény CKI1: Zejména díky možnosti využití FPLC (zakoupeného z prostředků Centra v roce 2006) bylo izolováno dostatečné množství proteinu přijímačové domény receptorové histidinkinázy CKI1, a to v kvalitě a čistotě, která umožnila získat difrakující krystaly. Měření na synchrotronu v Hamburku byla získána data umožňující identifikovat strukturu této domény s rozlišením těsně pod 2,0 Å. V současnosti jsou prováděny výpočty, umožňující přesné stanovení celé struktury. **(MU+zahr.)**

Regulace genové exprese u rodiny genů AHP z *Arabidopsis thaliana*: Byla zjištěna transientní aktivace genů *AHP1-4* v odpovědi na krátkodobé zvýšení jak endogenních cytokininů isoprenoidního typu, tak aromatických cytokininů. Při dlouhodobé kultivaci v přítomnosti cytokininů byl nárůst exprese genů *AHP1-4* pozorován pouze v případě aromatických cytokininů. Exprese genu *AHP5* nebyla za použitých experimentálních podmínek cytokininy ovlivněna.

(MZLU+UEB)

Analýza struktury a funkce proteinů AHP: V roce 2007 jsme dále pracovali na expresi a purifikaci všech šesti AHP proteinů a na jejich krystalizaci. V současné době jsme získali první krystaly a pracujeme na jejich další analýze a přípravě krystalů vhodných pro strukturní měření. Ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství (Dr. Faldyna) jsme připravili monoklonální protilátky proti vybraným proteinům, které plánujeme využít při studiu biologické funkce AHP proteinů na buněčné úrovni. Pomocí technologie gateway jsme připravili recombinantní proteiny, translační fúze AHP proteinů s různými fluoreskujícími proteiny a to jak na N, tak i C konci. Konstrukty kódující tyto fúzní proteiny pak byly použity pro přípravu transgenních rostlin *Arabidopsis*. Získali jsme první nadějně výsledky z analýz proteinů AHP pomocí kapilární elektroforézy v kombinaci s fluorescencí indukovanou laserem (CE-LIF). V budoucnu bychom chtěli využít tuto metodu pro kvantifikaci fosforylace proteinů AHP. **(MU)**

Identifikace možných dalších proteinů podílejících se na regulaci a přenosu cytokininového signálu u rostlin

Proteomická analýza ranných odpovědí na cytokininy: V roce 2007 byla provedena analýza rané odpovědi proteomu *Arabidopsis* na exogenní aplikaci cytokininů. Získané výsledky jsou připravovány k publikaci. **(MU)**

Fosfoinositidový signální systém

Byla prakticky dokončena charakterizace kolekce inserčních mutantů T-DNA u genů pro enzymy fosfolipidové signální dráhy u rostlin. U většiny těchto linií byla zvýšena zásoba semen, která jsou k dispozici dalším řešitelům centra. Byla zahájena předběžná charakterizace získaných inserčních linií vzhledem k jejich odpovědi na působení kyseliny salicylové (SA). Bylo zjištěno, že indukce některých genů regulovaných SA je snížena v mutantní linii *p/dy3*, což ukazuje na roli této isoformy PLD v signální dráze SA. Byla prokázána jak aktivace PLD (nárůst fosfatidylbutanolu v ošetřených buňkách), tak aktivace PI-4 kinas, vedoucí k významnému nárůstu hladiny fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu, který je modulátorem aktivity PLD a ovlivňuje též dynamiku aktinového cytoskeletu. Příímá souvislost mezi oběma enzymy v signální dráze SA bude předmětem dalšího zkoumání. **(VSCHT+zahr.)**

Pokračuje charakterizace inserčních T-DNA-mutantů *A. thaliana* pro všech šest genů kódujících fosfolipasu C specificky štěpící fosfatidylcholin (PC-PLC). Je studována možná úloha PC-PLC v přenosu signálů brassinosteroidů. Aktivita PC-PLC se zvýšila po přidání 24-epi-brassinolidu (10nM až 1mM) k buňkám tabákové linie BY-2 až dvojnásobně

(po 24 hodinách). Zvýšení však bylo detekovatelné již po 15 minutách, což ukazuje na možnou úlohu tohoto enzymu v procesech souvisejících s přenosem signálů brassinosteroidů. **(UEB+zahr.)**

Studium interakce různých isoform fosfolipasy D s cytoskeletem *in vitro*: V experimentech *in silico* byly porovnávány aktin- nebo tubulin-vázající oblasti v isoformách rostlinných fosfolipas D s oblastí popsanou pro živočišnou PLD. Ze sekvenčních analýz aktin- nebo tubulin-vázajících oblastí vyplývá, že s tubulinovým cytoskeletem by mohla interagovat fosfolipasa D ζ 1,2 (PXP Φ PLD) a s aktinovým cytoskeletem jiná isoforma fosfolipasy D, především fosfolipasa D β (C2 PLD). Pro studium interakce fosfolipasy D ζ 1,2 s tubulinem *in vitro* byla zvolena afinitní chromatografie na nosiči s vázaným tubulinem. Aktivita PLD nebyla za podmínek experimentu měřitelná a bude tedy pro další výzkum nutné získat semena se zvýšenou expresí *pld ζ 1* a *pld ζ 2*. **(VSCHT)**

Na základě předchozích výsledků experimentů „pull down“ s GST-fúzními proteiny provedených v minulém roce a sekvenční analýzy aktin-vázající oblasti u eukaryotických fosfolipas D usuzujeme, že vazba PLD-aktin je pravděpodobně zprostředkována pouze několika konservovanými aminokyselinovými zbytky, nikoliv konformační změnou celé oblasti. Pro vazbu by mohly být nezbytné aminokyseliny asparagin (N655 v HsapPLD2) a serin/threonin (S716 v sekvenci HsapPLD2). Pro potvrzení této hypotézy budou připraveny fragmenty NtPLD β 1 s bodovými mutacemi těchto aminokyselin. **(VSCHT+UEB)**

Metodou RT-PCR byly získány zatím částečné cDNA čtyř nových isoform PLD z pylu tabáku a byly zahájeny práce na klonování PLD z pórku jakožto modelové jednoděložné rostliny vhodné pro experimenty s transienní expresí značených a jinak modifikovaných proteinů. Bylo též zahájeno klonování cDNA vybraných PLD isoform z *Arabidopsis*, kde dosud klony nejsou k dispozici. **(UK+UEB)**

Při studiu interakce PLD a aktinového cytoskeletu pokračovalo sledování vlivu vápníku ve srovnání s dalšími kationty na tuto interakci spolu s pokračující snahou připravit bodově mutované konstrukty, které by pomohly (spolu se srovnáním s PLD, které neinteragují s aktinem) odhalit vazebné místo. Do stadia publikace se blíží rozsáhlá fylogenetická studie srovnávající PLD napříč hlavními větvemi stromu života. Postupuje úsilí o dokončení klonování celých cDNA vybraných PLD. Bylo zahájeno klonování fragmentů PLD z pórku, který slouží také jako experimentální systém pro studium interakcí PLD a cytoskeletu. **(ÚEB+VSCHT+UK+zahr.)**

Úloha PXP Φ fosfolipasy D v morfogenezi rostlinných buněk: Byla provedena detailní analýza reorganizace mikrotubulárního cytoskeletu v kořenových buňkách *A. thaliana* za stresových podmínek. Jako abiotický stresor byly vybrány hlinité kationty, které jsou pro eukaryotické buňky toxické a primárním projevem této toxicity je rychlá zástava kořenového růstu a změny cytoskeletu. Z klíčových hráčů fosfolipidové dráhy byla vybrána PXP Φ fosfolipasa D (PLD ζ 1,2), protože byla popsána souvislost mezi tímto enzymem a růstem kořene. Porovnáním reorganizace mikrotubulárního cytoskeletu v kořenové špičce divokých rostlin *A. thaliana* a dvojitých knock-out mutantů *pld ζ 1/pld ζ 2* po působení Al³⁺ jsme však žádnou souvislost mezi fosfolipasou D ζ 1,2, dynamikou mikrotubulů a ani inhibicí kořenového růstu neprokázali. **(VSCHT+UK)**

Byly zahájeny farmakologické studie směřující ke zmapování role PA fosfatáz (PAP) v signální dráze PLD; počáteční výsledky potvrzují hypotézu, že PAP je negativním regulátorem PLD. Byly také připraveny konstrukty pro expresi PAP za účelem získání protilátek pro biochemické studie a pro transienní expresi fluorescenčně značeného proteinu. **(UK)**

Analýza funkce pylově specifických NADPH oxidáz (NOX; za použití u rostlin jen málo využívané metody transfekce modifikovanými DNA antisense-oligonukleotidy) ukázala, že aktivita NOX a jimi produkovaných reaktivních forem kyslíku (ROS) je obecnou vlastností polarizovaného růstu rostlinné buňky. Naše výsledky také ukazují na regulační souvislost mezi koncentrací volného cytoplasmatického vápníku, aktivitou NOX/produkcí ROS a oscilačním růstem pylové láčky (Potocký et al., New Phytologist 2007). (UEB+VSCHT+UK)

Plány na rok 2008:

- Studium interakce cytokininů a světla v regulaci morfogeneze u *Arabidopsis thaliana* (MZLU)
- Analýza přenosu cytokininového signálu na buněčné úrovni (MU)
- Analýza raných odpovědí proteomu na exogenní aplikace cytokininů (MU)
- Analýza role CKI1 v tvorbě vodivých pletiv - publikace výsledků (MU)
- Studium struktury přijímačové domény CKI1 - publikace výsledků (MU)
- Genetická analýza mutantů se změnou exprese CKI1 (MU)
- Analýza struktury a funkce genů AHP - zejména zavedení a optimalizace analýzy fosforylace proteinů AHP pomocí CE-LIF, a to jak na čistém proteinu, tak v hrubém rostlinném lyzátu (MU)
- Stanovení exprese vybraných regulátorů odezvy v *A. thaliana*, které by umožnily sledovat přenos cytokininového signálu (UEB)
- Dokončení studia úlohy PC-PLC v procesech souvisejících s přenosem signálů brassinosteroidů (UEB)
- Klonování alespoň jedné kompletní cDNA nové isoformy PLD z *Arabidopsis*, rozšíření experimentů na tuto modelovou rostlinu (UK)
- Charakterizace mutantů *Arabidopsis* s T-DNA insercí ve čtyřech různých isoformách PLD (UK+VSCHT)
- Příprava mutantů aktin-vázající oblasti NtPLDβ1 a studium přímé interakce s aktinem (spadá i pod V004) (VSCHT+UK)
- Studium účasti PLD v signální dráze cytokininů na mutantních liniích rostlin *A. thaliana* s regulovanou expresí genů pro biosynthesu cytokininů s využitím farmakologického přístupu (UEB+VSCHT+MU)
- Charakterizace role PAP *in vivo* s využitím inhibitorů a antisense oligonukleotidů (též s využitím značených nízkomolekulárních substrátů, příprava protilátek proti PAP a zahájení experimentů s expresí fluorescenčně značené PAP); pokračování (UK+UEB)
- Příprava konstruktů pro studium interakcí PLD a PAP ve dvouhybridním kvasinkovém systému (pokračování) (UEB+UK+VSCHT)
- Měření membránového potenciálu, vstupu vápníku do buňky a detekce volných kyslíkových radikálů na buňkách pylových láček (ROS) (UK)
- Vyhledání postupů umožňujících identifikaci a kvantifikaci membránových proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (VSCHT)

VO07 Poznat a charakterizovat mechanizmy homeostáze fytohormonů auxinového a cytokininového typu ve vztahu k regulaci morfogeneze

Metabolismus cytokininů

Rostlinné hormony cytokininy jsou důležitými regulátory mnoha vývojových procesů rostlin. Jejich významné fyziologické funkce byly potvrzeny exogenní aplikací nebo studiem transgenních rostlin, u nichž byly z funkce vyřazeny geny kódující enzymy biosyntézy (isopentenyltransferasy), receptorové histidinkinasy, cílové proteiny transdukce cytokininového signálu, nebo studiem rostlin nadprodukcujících enzymy degradace cytokininů (cytokininoxidasy/dehydrogenasy, CKX). Pomocí těchto rostlin byly odhaleny důsledky ovlivnění endogenních hladin cytokininů, jako např. zvětšení kořenového systému a objemu semen, či oddálení senescence (zajímavé z agronomického hlediska). Mezi strukturálními deriváty přirozených cytokininů byly nalezeny a charakterizovány látky inhibující degradační enzym cytokininů CKX. Aplikace inhibitoru CKX, MZO2Cl, poukazuje na dosud málo známé funkce cytokininů při regulaci vývoje reprodukčních orgánů a kvetení. (UEB)

Byly připraveny nové deriváty 6-benzylaminopurinu s vysokou cytokininovou aktivitou v řadě klasických biotestů. Tyto látky byly rovněž testovány pro svoji afinitu na receptorech *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 a AHK3. Zjistili jsme, však, že tyto aromatické cytokininy nevykazují příliš silnou vazbu na známé cytokininové receptory. Zdá se tedy pravděpodobné, že bude existovat jiný, zatím neprobádaný systém transdukce těchto cytokininových signálů v rostlině. V tomto roce byly na tyto deriváty uděleny 4 mezinárodní patenty. (UEB)

Při studiu funkce a biologického významu farnesylylace isopentenyltransferázy (IPT3), enzymu katalyzujícího biosyntézu isoprenoidních cytokininů, byl stanoven vliv zvýšené exprese *AtIPT3* na farnesyl-positivním (WT) a farnesyl-negativním (mutant *era1-2*) na změny fenotypu rostlin *Arabidopsis*. Akumulace cytokininů v rostlinách se zvýšenou expresí IPT3, (linie *AtIPT3-OE*) měla výrazný vliv na vývoj kořenů. Tento účinek byl zrušen při blokování farnesylylace jakož i katalytické aktivity enzymu výměnou farnesyl-vazebného cysteinu (Cys-333) za nevazebný serin (mutant *AtIPT3^{C333S}*). Mladé listy rostlin se zvýšenou expresí *AtIPT3* na farnesyl-positivním (*AtIPT3-OE*) i na farnesyl-negativním (*era1-1AtIPT3-OE*) pozadí byly výrazně menší ve srovnání s výchozími rostlinami (WT). Poměr velikostí listů obou skupin byl, díky rychlejšímu růstu rostlin exprimujících *AtIPT3*, postupně zvrácen. Plochy prvních listů dospělých rostlin *AtIPT3-OE* a *era1-1AtIPT3-OE* byly o 70%, resp. o 100% větší ve srovnání s kontrolou (WT). Zvětšení plochy listů bylo výsledkem zvýšeného počtu buněk v listech rostlin *AtIPT3-OE*, což odpovídá stimulačnímu působení cytokininů na buněčné dělení jakož i růst a vývoj listů. Eliminace farnesylylace a katalytické aktivity u rostlin *AtIPT3^{C333S}* rovněž eliminovala rozdíly v obsahu cytokininů a ve vývoji listů ve srovnání s netransformovanou kontrolou. Obsahy chlorofylu a+b pozitivně korelovaly s endogenními hladinami cytokininů a s prodloužením vegetačního období u linií exprimujících *AtIPT3* (Galichet et al., *Plant Physiology*, v tisku). (UEB)

S použitím transgenních rostlin tabáku exprimujících geny kódující degradaci nebo biosyntézu cytokininů (CKX, IPT) byly studovány korelace mezi enzymovou aktivitou cytokininoxidázy/dehydrogenázy (CKX) a obsahem endogenních cytokininů, s důrazem na převládající deriváty *cis*-zeatinu a stanoven jejich fyziologický význam. U cytokinin-deficitních rostlin tabáku bylo zjištěno, že zvýšená exprese *AtCKX2* genu vede k výraznému vzrůstu aktivity CKX, následné redukci obsahu cytokininů (zejména na úrovni neaktivních *N*-glukosidů a cytokininů *cis*-zeatinového typu) a změnám fenotypu včetně zpomalení vývoje a pozdějšího nástupu stárnutí a je doprovázena zvýšením aktivit

antioxidačních enzymů. To naznačuje, že ke zpomalení vývoje transgenních rostlin může docházet v důsledku existence a uplatnění účinnějšího „ochranného“ antioxidačního systému (rukopis v přípravě). Korelace mezi metabolismem endogenních cytokininů, aktivitou CKX a možnou adaptací rostlin vůči stresům byla zaznamenána i v *Pssu-IPT* transformovaných rostlinách tabáku s nadprodukcí cytokininů a zvýšenou aktivitou CKX indukovanou cytokininy. (UEB)

V *AtCKX1*-transformovaných rostlinách bramboru bylo zjištěno, že na redukcí hladin endogenních cytokininů vyvolané zvýšením aktivity CKX v důsledku exprese *AtCKX1* se podstatnou měrou podílí neaktivní *N*-glukosidy a deriváty *cis*-zeatinu poklesem svých koncentrací. U transgenních cytokinin-deficitních rostlin bramboru pěstovaných *in vitro* byly zaznamenány výrazné fenotypové změny zahrnující např. zkrácení výhonů a vyšší produkci hlízek, což ukazuje na možné využití strategie indukovaných změn endogenních hladin cytokininů v praxi. Ve vybraných rostlinných materiálech byla s využitím radioaktivně značených substrátových cytokininů a na základě kompetičních testů prověřena možnost degradace *cis*-zeatinu aktivitou CKX a porovnána s degradační schopností CKX pro *trans*-zeatin a iP. Zatímco ve většině případů byla ve shodě s literárními údaji zjištěna substrátová specifita CKX pro *iP* > *trans-Z* > *cis-Z*, u některých materiálů, zejména s převahou cytokininů *cis*-zeatinového typu (např. list tabáku, pšenice, ovsa), byl *cis-Z* výrazně lepším substrátem CKX než jeho *trans*-isomer a ojediněle (např. pletiva mechu *Physcomitrella*) dokonce než iP. (UEB) Metabolismus cytokininů (endogenní hladiny a aktivita cytokininoxidázy/dehydrogenázy) byl sledován během ontogeneze *Nicotiana tabacum*. V průběhu senescence se ustavil gradient aktivních cytokininů ve prospěch horních listů, který zřejmě souvisí se zvýšením síly jejich sinku. Snížení jejich hladiny ve spodních listech bylo doprovázeno s degradací chlorofylu (Havlová et al., Plant Cell Environ., v tisku). (UEB)

Metabolismus cytokininů byl rovněž sledován v rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Nejvyšší hladiny fyziologicky aktivních cytokininů a jejich bezprostředních prekurzorů fosfátů byl nalezen v apikálním meristému. V listech růžice a v kořenech byl jejich obsah výrazně nižší. V současné době jsou optimalizovány podmínky RT PCR pro geny biosyntetické a degradační dráhy cytokininů. (UEB+MZLU)

Molekulární determinace substrátové specifity β -glukozidáz uvolňujících aktivní cytokininy z jejich *O*-glukozidů: Srovnání aktivních center dvou β -glukozidáz (*Zm-p60.1*, *Z. mays*; *Bg14:1*, *B. napus*) uvolňujících aktivní cytokininy z jejich *O*-glukozidů ukázalo velmi odlišné uspořádání vazebného místa pro aglykon přičemž celková příbuznost těchto enzymů na úrovni aminokyselin dosahuje 44% identity. Jako první krok k porozumění molekulární evoluce těchto vazebných míst byly v molekule *Zm-p60.1* provedeny jednotlivé bodové a čtyřnásobná mutace v klastru hydrofobních aminokyselin F193-F200-W373-F461, který u *Zm-p60.1* podmiňuje afinitu k hydrofobním aromatickým aglykonům. Výsledné mutanty (F193A, F200K, W373K, F461L a F193A-F200K-W373K-F461L) obsahovaly v mutovaných pozicích aminokyselinové zbytky nalezené v ekvivalentních pozicích *Bg14:1*. Byly charakterizovány fyzikálně-chemické a enzymatické vlastnosti připravených mutant produkovaných v *E. coli*. Zatímco jednotlivé bodové mutace neměly zásadní vliv na celkovou strukturu proteinu, akumulace všech čtyř mutací v témž mutantním proteinu vedla k výraznému posunu poměru α šroubovic a β řetězců. Enzymatická aktivita byla mírně zvýšená u F461L, zatímco u ostatních mutant bylo zjištěno její snížení. Metodou řízené evoluce na těchto templátech jsou vyhledávány mutace, které povedou k restauraci strukturních a katalytických vlastností mutantních proteinů. (MZLU+MU)

Role vakuoly v procesu reverzibilní glukozylace cytokininů, jednoho z prvků jejich homeostáze: Srovnávací analýzy transgenních rostlin tabáku akumulujících přirozenou formu kukuřičné β -glukozidázy *Zm-p60.1* v plastidech/

/chloroplastech a její rekombinantní variantu ve vakuolách bylo prokázáno, že v intaktních rostlinách je většina *O*-glukozidů cytokininů ukládána ve vakuolách. Byly zjištěny rozdíly v citlivosti uvedených transgenních rostlin k exogenním cytokininům a je charakterizována jejich citlivost k účinkům dalších hormonů, zejména auxinů, a změnám v dostupnosti živin. (MZLU+UEB)

Analýza interakcí cytokininů a auxinů a jejich role při morfogenezi rostlin *de novo*

S využitím tzv. hypokotylového testu byla zjištěna zajímavá data, která přináší nové údaje o molekulární podstatě vzájemné interakce cytokininů a auxinů během morfogeneze rostlin. Naše výsledky ukazují na roli cytokininů v regulaci tvorby auxinových maxim během morfogeneze a organogeneze *de novo*. Tyto výsledky byly podpořeny výsledky analýz akumulace radioaktivně značených auxinů v buňkách tabáku. V současné době jsou dokončovány poslední analýzy a výsledky jsou připravovány k publikaci. (MU+UEB)

Pomocí systému regulovatelné exprese se podařilo zjistit vliv hladiny endogenních cytokininů na růst kořene a distribuci auxinu během tvorby laterálních kořenů. Rukopis byl zaslán do recenzního řízení (Kuderová et al.). (MU)

Plány na rok 2008:

- Stanovení exprese vybraných isopentenyltransferáz a cytokininoxidáz/dehydrogenáz v apikálním meristému, listech růžice a v kořenech *Arabidopsis thaliana* (UEB)
- Stanovení vlivu sníženého obsahu cytokininů v důsledku exprese CKX genu (AtCKX1 a AtCKX2) na změny v hormonální rovnováze (změny v poměru CKs, ABA a IAA) a jejich vztah k fenotypu rostlin tabáku a bramboru (UEB)
- Vývoj účinnějších a specifitějších inhibitorů CKX, a pravých cytokininových antagonistů, jejichž mechanismem účinku je blokování percepce endogenních cytokininů (regulace percepce a degradace cytokininů specifickými inhibitory přináší nástroj regulace růstu a vývoje rostlin užitečný z hlediska studia fyziologických funkcí cytokininů v různých vývojových stádiích rostlin, ale také z hlediska možného zemědělského využití) (patří i do dílčího cíle V005) (UEB)
- Stanovení molekulární determinace substrátové specifity u β -glukozidázy Zm-p60.1 metodami místně cílené mutagenese a enzymové kinetiky s cílem přispět k porozumění mechanismům určujícím její aktivitu vůči *O*-glukozidům cytokininů (pokračování) (MZLU)
- Charakterizace účinku přesměrování β -glukozidázy Zm-p60.1 z plastidů/chloroplastů do vakuoly na homeostázi cytokininů a případné ovlivnění hladin auxinu a kyseliny abscisové (pokračování) (MZLU + UEB)
- Studium molekulární podstaty interakce cytokininů a auxinů během morfogeneze rostlin (MU)
- Hormonální komunikace mezi dělohami a listy klíčnicích rostlin tykve při lokálně indukované senescenci (UEB)

V006 Zavést a optimalizovat optické metody lokální detekce fyzikálně-chemických veličin s velmi jemným prostorovým rozložením pro studium buněčných struktur

V rámci zvolené koncepce (2006) měření fluorescenčních intenzit převodníků imobilizovaných na špičce vláknového taperu v r.2007:

- byly připraveny optické elementy - tapery s minimálním průměrem špičky 3 μm , s optickými ztrátami do 0.2 dB, mechanicky odolné vzhledem k pokrytí ochrannou vrstvou Indium-Tin-Oxide (ITO) o tloušťce cca 40 nm
- na základě provedených charakterizací (absorpční a fluorescenční spektrometrií) byl vybrán fluorescenční převodník 2',7'-Bis(2-carbonylethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF), schopný rozlišit ~ 0.2 pH, který absorbuje v oblasti 450-510 nm (pH 6-7), tj. v oblasti emisní čáry komerčně dostupného modulovatelného LD zdroje (473 nm), a emituje v oblasti 492-501 nm (pH 6-7) (Podrazky et al. 2007, Martan et al. 2007). (UFE)

Plány na rok 2008:

- Imobilizace převodníku na čelo taperu (metodou sol-gel) (UFE)
- Realizace optického uspořádání (UFE)
- Testy na rostlinném materiálu *in vitro* (UFE+UEB+UK)

4. Personální zajištění - změny oproti stavu na konci roku 2006

UEB: Pracovník plně placený z prostředků Centra: Jana Dobrá - náhradou za Marii Novákovou-Havlovou, která v roce 2007 pracovala pouze 3 měsíce, pak pro pracovní neschopnost (rizikové těhotenství) odešla na mateřskou dovolenou.

Místo Hany Soukupové (mateřská dovolená) nastupuje Lucie Brejšková. Od počátku roku pak nastoupila podle plánu na plný úvazek Hana Toupalová. Od října 07 nastoupil do centra také Matyáš Fendrych.

Žaneta Pochylová nastoupila dle plánu na celý úvazek (od 1.9.2007 do konce trvání Centra).

Od 1. 5. 2008 je Přemysl Pejchar zaměstnancem UEB. Do 1. 5. 2008 byl zaměstnancem VSCHT v Praze.

UK: Nastoupil nový doktorand Ivan Kulich. Jindřiška Fišerová se v roce 2007 podílela na řešení problematiky výzkumného centra v rámci několikaměsíční stáže v zahraniční laboratoři. Na uvedeném pracovišti však získala možnost víceletého postdoktorandského pobytu, a nebude se již dále podílet na řešení problematiky centra. Na její místo budou od roku 2008 přijati dva studenti PGS, Lenka Dvořáková a Miroslav Srba (který se na řešení projektu podílel již v tomto roce). Z peněz ušetřených ze mzdy J. Fišerové byla přijata na řešení projektu na část roku zahraniční studentka Gitanjali Nanda.

MU: žádné změny

VSCHT: Na řešení dílčího cíle V005 se podíleli tito postgraduální studenti (pracovní kapacitou 100%): Ondřej Krinke, Přemysl Pejchar a Jiří Šantrůček. O. Krinke odešel k 1.11. 2007. Na jeho místo byla přijata Ivana Duží. Přemysl Pejchar přešel 1.5. 2007 na UEB. Odpovídající částka (259 000,- Kč) byla poskytovatelem VSCHT snížena a navýšena do rozpočtového výdajového účtu UEB.

MZLU: Lubomír Janda proti původnímu předpokladu nenastoupil v lednu 2007 na plný úvazek jako člen řešitelského týmu přijatý na dobu řešení projektu. Jeho úkoly byly převzaty doktorandy Martinem Černým, Jaroslavem Pavlů a Přemyslem Součkem.

UFE: žádné změny

5. Nové i aktivně pokračující „staré“ mezinárodní spolupráce

5.1 Nové možnosti spolupráce:

- Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA: Strategic recruitment program for outstanding international graduate students from eastern Europe - Plant Biology. Návštěva tří pracovníků Purdue University v Praze a v Brně v říjnu 2007.
- Univ. Warwick, Warwick, Velká Británie: Benedikt Kost; efekторы ROP GTPáz ve vývoji pylu.
- Univ. v Sydney, Austrálie: Jan Marc; analýza funkce PLD.
- Faculty of Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Polsko: K. Strzalka; dvoutýdenní pobyt Mgr. Beranové v Krakově, měření na diferenciálním skenovacím kalorimetru.
- Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Rosario, Argentina: Diego de Mendoza; týdenní pobyt Larisy Cybulski v Praze - konzultace o pokračování společných pokusů.
- Bulgarian Academy of Sciences, M. Popov Institute of Plant Physiology, Sofie, Bulharsko: K. Ananieva; metabolismus cytokininů a exprese genů v průběhu indukované senescence a následném zotavení v dělohách tykve (*Cucurbita pepo*).
- Polish Academy of Sciences, Institute of Bioorganic Chemistry: Jan Barciszewski; cytokininová aktivita přírodních látek a jejich syntetických derivátů.
- University of Belgrade, Faculty of Biology (I. Dragičević) a Institute for Biological Research (S. Ninković), Bělehrad, Srbsko: Morfologické vlastnosti a metabolismus fytohormonů v transgenických rostlinách bramboru exprimujících geny *AtCKX*.
- CiS Institut für Mikrosensorik, Erfurt, Německo: studijní pobyt T.Martana v rámci Marie Curie Research Training Network (jeden z výsledků SC do RWHT Aachen, červen 2007)
- IPT Jena, Německo: získání bilaterálního projektu GAČR a Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): "Theoretical and experimental research of optical fibre tapers for sensing applications" - H.Bartelt, J.Čtyrkoký, P.Tobiška a T.Martan (jeden z výsledků SC do IPT Jena, březen 2007)

5.2 Pokračující spolupráce:

- Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6/CNRS, FRE 2846 realizované formou doktorátu pod dvojitým vedením (co-tutelle Ing. Ondřeje Krinkeho, ukončení září 2007).

- Universität Tübingen, Centre for Cell and Molecular Biology of Plants, Laboratory of Developmental Genetics, od léta 2007 VIB Department of Plant Systems Biology, Ghent University, Belgie: Jiří Friml; tematika polárního transportu auxinu; probíhá vzájemná výměna experimentálního materiálu, společné publikace.
 - Horticulture Research International/University of Warwick, Wellesbourne, Velká Británie: Richard M. Napier; problematika receptorů pro auxiny a transportu auxinů; společné publikace.
 - Purdue University, Dept. of Horticulture, West Lafayette, USA: Angus Murphy a Wendy Peer; mechanismus transportu auxinu, výměna experimentálního materiálu a společná publikace.
 - Swiss Federal Institute of Technology, Curych, Švýcarsko: W. Gruissem; metabolismus cytokininů, výměna experimentálního materiálu a společná publikace.
 - Pohang University of Science and Technology, South Korea: Ildoo Hwang; mechanismus přenosu cytokininového signálu, sdílení experimentálního materiálu, podána společná patentová přihláška, společná publikace v přípravě.
 - University of Kwazulu-Natal, Research Centre for Plant Growth and Development, Jižní Afrika: Johannes Van Staden; nové růstové látky rostlin. Podány dva návrhy grantů (EU; 7RP).
 - Univ. Ghent, Faculty of Science, Gent, Belgie; Dominique van der Straeten: Přenos a „cross-talk“ hormonálních signálů, probíhá roční stáž J. Petráška v Gentu.
-

6. Publikované práce

6.1 Články

Články v impaktovaných časopisech (již standardně publikované, uvedeny abecedně):

Dvořáková L, Cvrčková F, Fischer L: Analysis of the hybrid proline-rich protein families from seven plant species suggests rapid diversification of their sequences and expression patterns. - *BMC Genomics* 8:412, 2007

IF = 4.03 (UK)

Hradecká V, Novák O, Havlíček L, Strnad M: Immunoaffinity chromatography of abscisic acid combined with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. - *J. Chromatography B* 847: 162-173, 2007

IF₂₀₀₆ = 2.647 (UEB)

Hradilová, J., Malbeck, J., and Brzobohatý, B.: Cytokinin regulation of gene expression in the *AHP* gene family in *Arabidopsis thaliana*. - *J. Plant Growth Regul.* 26: 229-244, 2007

IF₂₀₀₆ = 2.107 (MZLU)

Krinke O., Novotná Z., Valentová O., Martinec J.: Inositol trisphosphate receptor in higher plants: is it real? - *J. Exp. Bot.* 58: 361-376, 2007

IF = 3.630 (VSCHT+UEB)

Krinke O., Ruelland E., Valentová O., Vergnolle C., Renou J.P., Tacconnat L., Flemer M., Burketová L., Zachowski A.: Phosphatidylinositol 4-kinase activation is an early response to salicylic acid in *Arabidopsis* suspension cells. - *Plant Physiol.* 144: 1347-1359, 2007

IF = 6.125 (VSCHT+UEB+zahr.)

Potocký M., Jones M.A., Bezvoda R., Smirnov N., Žárský V.: Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. - *New Phytologist* 174 (4): 742-751, 2007

IF = 4.25 (UEB+UK+zahr.)

Souček, P., Klíma, P., Reková, A., and Brzobohatý, B.: Involvement of hormones and *KNOXI* genes in early *Arabidopsis* seedling development. - *Journal of Experimental Botany*, 58, 3797-3810, 2007

IF₂₀₀₆ = 3.630 (MZLU)

Spíchal L, Kryštof V, Paprskářová M, Lenobel R, Stýskala J, Binarová P, Cenklová V, De Veylder L, Kontopidis G, Fischer PM, Schmülling T, Strnad M: Classical anticytokininins do not interact with cytokinin receptors, but inhibit cyclin-dependent kinases. - *J. Biol. Chem.* 282(19): 14356-63, 2007

IF₍₂₀₀₆₎ = 5.8 (UEB+zahr.)

Zažímalová E, Křeček P, Skůpa P, Hoyerová K, Petrášek J: Polar transport of plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. - *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 1621 - 1637, 2007

IF₂₀₀₆ = 4.655 (UEB)

Články v impaktovaných časopisech (přijaté či v tisku, uvedeny abecedně):

Dhonukshe P, Grigoriev I, Fischer R, Tominaga M, Robinson DG, Hašek J, Paciorek T, Petrášek J, Seifertová D, Tejos R, Meisel LA, Zažímalová E, Gadella TWJ Jr, Stierhof Y-D, Ueda T, Oiwa K, Akhmanova A, Brock R, Spang A and Friml J: Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, conditionally accepted

IF₂₀₀₆ = 9.643 (UEB+zahr.)

Fischerová L, Fischer L, Vondráková Z, Vágner M (2007) Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differs in Norway spruce embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos. *Plant Cell Reports* (DOI 10.1007/s00299-007-0469-6)

IF₂₀₀₆ = 1.727 (UEB+UK)

Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M, Gruissem W: Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. - *Plant Physiology*, in press (doi:10.1104/pp.107.107425)

IF₂₀₀₆ = 6.125 (UEB+zahr.)

Havlová M, Dobrev PI, Motyka V, Štorchová H, Libus J, Dobrá J, Malbeck J, Gaudinová A, Vaňková R: The role of cytokinins in responses to water-deficit in tobacco plants over-expressing *trans*-zeatin O-glucosyltransferase gene under *35S* or *SAG12* promoters. - *Plant Cell Environ.*, in press

IF₂₀₀₆ = 4.135 (UEB)

Hoyerová K, Perry L, Hand P, Laňková M, Kocábek T, May S, Kottová J, Pačes J, Napier R, Zažímalová E: Functional characterization of PaLAX1, a putative auxin permease, in heterologous plant systems. - *Plant Physiology*, in press (DOI:10.1104/pp.107.109371)

IF₂₀₀₆ = 6.125 (UEB+zahr.)

Články v recenzovaných časopisech:

Mancuso S, Marras AM, Mugnai S, Shclicht M, Žárský V, Li G, Song L, Xue H-V, Baluska F.: Phospholipase D -zeta-2 drives vesicular secretion of auxin for its polar cell-cell transport in the transition zone of the root apex. - *Plant Signaling and Behaviour*, vol 2. ahead of publ., 2007 (UEB+zahr.)

Podrazky O, Mrazek J, Seidl M, Kasik I, Tobiska P, Matejec V, Martan T, Aubrecht J: "Optical principle of pH measurement for detection of auxin flow through cellular membrane". - *Proc. SPIE 6585 - Optical Sensing Technology and Applications*, Prague, April 2007, 65850Y.1-6580Y.7 (UFE)

Nerecenzovaný fulltext:

Martan T, Kanka J, Podrazky O, Kasik I, Matejec V: „Konicky zúžená optická vlákna“, *Optické komunikace*, O. K. 2005, Praha, November 2007, 89-97

6.2 Podané patenty

PV 2007-691, přihláška podána dne: 6/11/2007

Spíchal L, Popa I, Voller J, Doležal K, Strnad M, Werner T, Schmulling T: Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů a přípravky obsahující tyto sloučeniny (UEB+zahr.)

PV 2007-453, přihláška podána 6/11/2007

Strnad M, Spíchal L, Gemrotová M, Zatloukal M, Frébortová J, Galuszka P, Doležal K, Werner T, Schmulling T: Substituted 6-anilino-purine derivatives as inhibitors of cytokinin oxidase and compositions containing these derivatives (Substituované 6-anilino-purinové deriváty jako inhibitory cytokinin-oxidázy a přípravky obsahující tyto sloučeniny) (UEB+zahr.)

6.3 Diplomové a disertační práce

Krinke O.: Phospholipid signalling in the salicylic acid pathway of *Arabidopsis thaliana*, - Disertační práce VŠCHT v Praze a Université Paris 6, 2007

Petrášek J: Hormonal regulation of plant cell division and elongation. - Disertační práce, PŘF UK, Praha 2007, vypracována na UEB

Potocký M: Phospholipase D signaling pathways in plant cell polarity (Signální dráhy fosfolipasy D v regulaci buněčné polarity rostlin). - Disertační práce VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, 2007, vypracována částečně na UK a UEB

Synek L: EXO70A1, SEC6 and SEC8 proteins in plant cell morphogenesis. - Disertační práce, PŘF UK, Praha 2007, vypracována na UEB

Křepelová A: Úloha rostlinné fosfolipasy D ζ 1,2 v toxickém působení hliníku. - Diplomová práce, VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, 2007

6.4 Přednášky

Motyka V: The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase in control of cytokinin levels in plants. Martin-Luther-Universität, Landwirtschaftliche Fakultät, Halle-Wittenberg, Německo, 22.11.2007 (zvaná přednáška)

Zazimalova E: Dynamics of auxin transport across the plasma membrane - PINs, PGP, AUX/LAXs (and others?). - 19th IPGSA Congress, Puerto Vallarta, Mexico, July 21-25, 2007 (zvaná přednáška)

Zažímalová E: Mechanismus polárního transportu auxinu na buněčné úrovni - jednoduchý princip, komplexní regulace - Konference experimentální biologie rostlin/11. dny fyziologie rostlin, Olomouc, 8.7.-12.7. 2007 (zvaná přednáška)

Žárský V: Weizmann Inst., Rehovot, Izrael: Exocyst and NADPH oxidases in plant cell polarity, březen 2007 (zvaná přednáška)

Žárský V: Univerzita v Tel Avivu, Izrael: Exocyst in Angiosperm morphogenesis, březen 2007 (zvaná přednáška)

Žárský V: Oregon State Univ. in Corvallis, Oregon: Polarity machines in plant cells, září 2007 (zvaná přednáška)

Krinke O., Ruelland E., Valentová O., Burketová L., Zachowski A.: Phosphatidylinositol 4-kinase regulates the transcriptome of salicylic acid in Arabidopsis. Environmental signaling: Arabidopsis as a model, Utrecht, Nizozemí, 27.-29. 8. 2007 (příspěvek vybraný jako přednáška)

6.5 Postery

celkem 34:

- 19th Annual Meeting IPGSA, Puerto Vallarta, Mexiko, 21.7.-25.7. 2007 (9x)
- Calcium-based Signaling Systems in Plants, Dublin, Irsko, 5.12.-7.12. 2007 (1x)
- EMBO Conference series on Plant Molecular Biology "From basic genomics to systems biology", Ghent, Belgium, 2nd - 4th May 2007 (1x)
- 14th International Workshop on Plant Membrane Biology, Valencia, Spain, 26.6.-30.6. 2007 (2x)
- 3rd International Symposium on Plant Neurobiology, Štrbské pleso, SK, 14.-18.5 2007 (6x)
- Plant Biology and Botany Joint Congress, Chicago, USA, 2007 (1x).
- 18th International Conference on Arabidopsis Research, Peking, Čína, 2007 (1x).
- 3rd International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. University of Algarve, Faro, Portugal, 2007 (1x)
- Konference experimentální biologie rostlin / 11. dny fyziologie rostlin. Olomouc, ČR, 9.7.- 12.7. 2007 (11x)

- XV. Cytoskeletální klub, Vranovská ves, ČR, 9.5.-11.5. 2007 (1x)
 - Europrode 2008, Dublin, Irsko, 2008, accepted
-

7. Další aktivity vztahující se k Centru

- Web - byla vytvořena webová stránka centra na adrese: <http://remorost.ueb.cas.cz/>

- Seminář Ing. I. Kašíka (ÚFE AVČR) a Ing. L. Šaška CSc. s týmem SAFIBRA 30. 1. 2007

Program:

Optické vláknové sensory a optická vlákna

Přednáší: Ing. Ivan Kašík (Ústav fotoniky a elektroniky AVČR)

Program:

1. Optické vláknové sensory a optická vlákna (úvod, základní pojmy, principy)
2. Přehled optických vláknových sensorů - principy (fluorescenční, absorpční aj.) a analyty (pH, CO₂, O₂ aj.)
3. Optický hardware (makrooptika, planární a vláknová optika), příklady a ukázky
4. Úloha v Remorostu a její řešení

Přednáší: Ing. Ladislav Šašek CSc. s týmem SAFIBRA

Program:

1. Optické vláknové sensory a jejich aplikace - nabídka Safibry
2. Optický hardware (optické elementy, zdroje a vláknové lasery, detektory, optovláknové spektrometry, sestavy pro laboratoře) v nabídce Safibry; Precitec - skenování povrchů

- Letní setkání řešitelských týmů Centra základního výzkumu REMOROST, Čejkovice, 13. - 14. září 2007

program setkání je na adrese:

http://remorost.ueb.cas.cz/dokumenty/remorost_letni_setkani_2007_program.pdf