



Regulace morfogeneze rostlinných buněk a orgánů

Zpráva o průběhu prací Centra základního výzkumu LC06034
„Regulace morfogeneze rostlinných buněk a orgánů“
za rok 2008

Řešitelská pracoviště:

Ústav experimentální botaniky AV ČR - příjemce-koordinátor Zažímalová Eva, Doc. RNDr. CSc. - řešitelka koordinátorka	ÚEB
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	VŠCHT
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	ÚFE

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 diferenciací. 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.

Stručné informace o postupu prací v roce 2008 jsou přiřazeny níže k příslušným dílčím cílům projektu 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.

Dílčí cíl V001 byl čistě metodický a zaměřený také na přípravu experimentálního materiálu. V elektronické periodické zprávě o činnosti Centra byl ukončen k 31.12.2007. Postup prací v rámci tohoto dílčího cíle byl průběžně včleňován do dalších dílčích cílů, které odrážejí konkrétní biologickou problematiku. Nicméně, zpráva pro Radu centra za rok 2007 obsahuje i bodový plán pro rok 2008 a proto bude tato metodická část i v této zprávě uvedena pod dílčím cílem V001 s odkazy na další dílčí cíle, jichž se týká.

"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 a průběžně jsou shromažďovány podklady.

1. Nákup investic z prostředků Centra

Na rok 2008 již žádné investiční prostředky nebyly pro práci Centra plánovány.

2. Průběh prací v roce 2008 a plány na rok 2009

Dílčí cíl 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

Charakterizace oligomerizace přenašečových molekul rodiny PIN. Vzhledem k náročnosti anizotropních měření byla k průkazu možné oligomerizace přenašečů typu PIN připravena linie tabáku BY-2

exprimující molekuly přenašečů tagované současně GFP a RFP. Dále bude testována možnost detekovat oligomerizace molekul PIN metodou FCS. (ÚEB+UK)

Příprava konstruktů pro expresi fúzních proteinů. Byly připraveny konstrukty pro expresi fúzních proteinů GFP-HSP90, GFP-TANGLED a mCherry-fimbrinu. Izolace genu kódujícího protein CLASP byla částečně úspěšná, vzhledem k extrémní velikosti proteinu jsou v současné době modifikovány metody pro izolaci celého genu. Byla získána linie BY-2 stabilně exprimující fúzní protein GFP-HSP90. Exprese GFP-HSP90, GFP-TANGLED a mCherry-fimbrin byla dále testována pomocí biolistické metody transformace. V současné době jsou analyzovány lokalizace těchto fúzních proteinů v buňce. (UK) Dále byly připraveny fúzní genové konstrukty mRFP1 (s PIN1 a PIN7). (ÚEB)

Optimalizace biolistické metody transformace u rostlin. Biolistická metoda transformace se prokázala jako mimořádně vhodná pro studium raných fází exprese fúzních proteinů v rostlinných buňkách a je v současnosti již úspěšně používána. (UK)

Optimalizace kultivačních podmínek buněčných suspenzních kultur. Bylo testováno široké spektrum koncentrací auxinů a cytokininů v médiích pro ustavení buněčných suspenzí za účelem zvýšení jejich rozpadavosti. (ÚEB)

Zavedení metody transformace pro suspenzní kultury Arabidopsis. S úspěchem byla zavedena metoda transformace suspenzních kultur *Arabidopsis thaliana*, využívající protokol původně určený pro suspenzní buňky tabáku. Pomocí této metody byly již selektovány linie exprimující DR5rev::GFP a PIN1::PIN1:GFP. (ÚEB)

Dílčí cíl V001 - Plány na rok 2009:

- Transformace rostlin *Arabidopsis* fúzním proteinem GFP-HSP90 pro studium kolokalizace HSP90 s MT (UK)
- Testování funkce této interakce v různých buněčných typech (ÚEB+UK)
- Příprava rekombinantního proteinu HSP90 pro studium interakčních partnerů HSP90 v buňce
- Analýza exprese GFP-TANGLED a klonování celé sekvence CLASP pro účely studia role tohoto proteinu v interakci MT a dalších struktur, zejména aktinu - pokračování (ÚEB+UK)
- Příprava dalších spektrálních variant fúzních proteinů (především pro přenašeče auxinů) - pokračování (ÚEB)
- (další body viz další dílčí cíle).

(Všechny zde uvedené body tvoří obecný metodický základ pro dílčí cíle V002-V005 a V007).

Dílčí cíl V002: Charakterizovat molekulární komponenty polárního transportu auxinů a jejich dynamiku na plasmatické membráně

Izolace genů pro přenašeče auxinů z tabáku: S využitím genomické databáze tabáku *Nicotiana tabacum* byly izolovány části genů tabáku, homologní ke genům *PIN* a *AUX1/LAX* z *Arabidopsis thaliana*. (ÚEB)

Izolace a charakterizace genu PaLAX1: Z plané třešně (*Prunus avium*) byl izolován gen PaLAX1. Gen a jeho produkt jsou na úrovni cDNA i proteinu sekvenčně velmi podobné cDNA i odpovídajícím proteinům z rodiny genů AtAUX/LAX, které kódují předpokládané přenašeče auxinu do buňky. U transgenních linií tabáku a *Arabidopsis* jsme prokázali, že nadměrná exprese genu PaLAX1 je doprovázena změnou v obsahu a distribuci kyseliny indol-3-octové, základního endogenního auxinu. Zvýšení obsahu tohoto auxinu v transgenních rostlinách vedlo k výrazným změnám fenotypu. V transgenních liniích se třikrát zvýšil příjem syntetického auxinu 2,4-D. Tento zvýšený příjem, způsobený expresí genu PaLAX1, byl eliminován po přidání specifického inhibitoru přenašečů auxinu do buňky do kultivačního média. V mutantních rostlinách *aux1*, jejichž auxinový přenašeč AUX1 není funkční a kořeny těchto rostlin jsou proto agravitropní, jsme expresí genu PaLAX1 obnovili gravitropní odpověď (Hoyerová et al., Plant Physiol. 2008). (ÚEB+zahr)

Charakterizace mechanismu spolupráce dvou typů přenašečů auxinů z buňky - PGP a PIN: Auxin jako signální molekula řídí rostlinnou morfogenezi prostřednictvím svých gradientů, které jsou ustavovány mezibuněčným transportem. Pro vymezení rychlosti tohoto procesu je klíčový transport auxinu z buněk zprostředkovaný proteiny typu PIN a PGP. Mechanismus jejich vzájemné spolupráce však zatím není objasněn. Pomocí indukovatelných rostlinných i buněčných linií jsme ukázali, že oba systémy, PIN-dependentní i PGP-dependentní, zprostředkují transport auxinu, ale hrají odlišné vývojové role. Jsou exprimovány během embryogeneze, organogeneze i tropizmů. V jejich průběhu spolupracují jak synergisticky, tak antagonisticky, ale vždy zajišťují asymetrické rozložení auxinu v daném pletivu. Navrhli jsme model, ve kterém transport auxinu zprostředkovaný proteiny PGP slouží k ustavení určitých hladin auxinu v buňkách, které tvoří jakési hlavní kanály toku auxinu, a zajišťují tak zdroj tohoto hormonu pro jeho směrový transport. Tento směrový transport je poté zprostředkovaný proteiny PIN (Mravec et al., Development 2008). (ÚEB+zahr)

Interakce inhibitorů polárního transportu auxinů s aktinovým cytoskeletem: Vývoj rostlin je v mnoha ohledech závislý na nerovnoměrné distribuci rostlinné signální molekuly auxinu. Při formulování tohoto pojetí hrály důležitou roli inhibitory polárního transportu auxinu, tj. látky schopné ovlivňovat směrovaný tok auxinu rostlinou. Navzdory tomu, že se tyto látky ve výzkumu využívají již dlouhou dobu, nebyl mechanismus jejich působení doposud objasněn. V této práci je ukázáno, že inhibitory transportu auxinu kyselina 2,3,5-trijodbenzoová (TIBA) a kyselina 2-(1-pyrenoyl)-benzoová (PBA) brzdí pohyb váčků nejen v buňkách rostlin, ale i kvasinek a živočichů pomocí stabilizace aktinového cytoskeletu a že naopak chemická či genetická stabilizace aktinového cytoskeletu zasahuje procesy endocytosy, pohyb váčků, transport auxinu a vývojové procesy závislé na auxinu u rostlin. Tyto výsledky ukazují také, jak procesy založené na pohybu váčků po aktinovém cytoskeletu a společně mnoha eukaryotním organismům, mohou u rostlin plnit specifickou fyziologickou roli (Dhonukshe et al., PNAS 2008). (ÚEB+zahr) (Spadá též do dílčích cílů V003 a V004).

Studium procesů spojených s inhibicí axilárních pupenů hrachu po obnově apikální dominance: Byly sledovány změny exprese *PsAD1*, *PsDRM1*, *PsPIN1* a *PsAUX1* v jednotlivých axilárních pupenech na rostlinách dekapitovaných nad druhým nebo třetím axilárním pupenem. Exprese *PsAD1* a *PsDRM1*

v podstatě odpovídá růstové aktivitě pupenů stanovené na základě růstových křivek. (Buchtová, 2008). Změny v expresi obou genů membránových přenašečů auxinu nejsou tak výrazné jako u *PsAD1* a *PsDRM1* (Obálová 2008), nebo jako změny exprese obou genů ve stonku pod vyrůstajícím pupenem, kde dochází k vytvoření vaskulárního napojení pupene, které předchází jejich *de novo* expresi (Balla et al., submitted, Tesaříková 2008). (MZLU+MU)

Dílčí cíl V002 - Plány na rok 2009:

- Izolace dalších částí genů tabáku homologních ke genům PIN a AUX1/LAX z *Arabidopsis thaliana* s využitím genomické databáze *Nicotiana tabacum* - pokračování (ÚEB)
- Klonování částí genů, homologních ke genům PIN a AUX1/LAX z *Arabidopsis thaliana*, izolovaných z *Nicotiana tabacum* do expresních vektorů a jejich exprese ve fúzi s molekulárním markerem GFP (ÚEB) (spadá částečně také pod dílčí cíl V001)
- Příprava různých transgenních linií tabáku a *Arabidopsis*, nesoucích geny pro přenašeče auxinů do buňky a gen pro možný receptor auxinů *AtABP1* pod indukovatelnými promotory, a jejich charakterizace - pokračování (ÚEB) (spadá částečně také pod dílčí cíle V001 a V005)
- Příprava transgenních linií tabáku a *Arabidopsis*, nesoucích fúzní genové konstrukty mRFP1 (s PIN1 a PIN7) a jejich charakterizace (ÚEB)
- Izolace a charakterizace hypotetického proteinu vázajícího nekompetitivní inhibitory polárního transportu auxinů - pokračování (ÚEB+MU)
- Charakterizace funkce inhibitorů transportu auxinů na úrovni přenosu do buňky (ÚEB)
- Charakterizace dalších přenašečů auxinů z rodiny PIN na buněčné a molekulární úrovni - pokračování (ÚEB+zahr)
- Charakterizace endocytotického kroku konstitutivního cyklování proteinů PIN v buněčných kulturách tabáku a *Arabidopsis* - pokračování (ÚEB+UK+zahr)
- Matematické modelování toku auxinů rostlinnou buňkou (ve spolupráci s Fakultou biomedicínského inženýrství ČVUT) (ÚEB)
- Charakterizace interakce strigolaktону s polárním transportem auxinu (především ve vztahu k inhibici růstu axilárních pupenů) (MZLU+ÚEB+MU+zahr)

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

Charakterizace komplexu exocyst: Hlavním přínosem letošního roku pro studium rostlinného exocystu bylo vedle základní publikace prokazující existenci a funkci komplexu v rostlinných buňkách (Hála et al., Plant Cell 2008) získání dalších dokladů o vztahu exocystu k polárnímu transportu auxinu. Mikroskopická analýza mutantů *exo70A1* ukázala rozdíl ve stavbě kořenové čepičky. Čepička mutantních semenáčků pěstovaných na vertikálním agaru se skládá zhruba z dvojnásobného počtu vrstev než u normálních rostlin, což může být způsobené například slabou sekrecí degradačních

enzymů, které buňky čepičky normálně rozvolňují a může přímo souviset také s poruchami v dynamice toku auxinu. Vizualizace auxinových maxim pomocí reporterového genu *GUS* pod promotorem DR5 ukázala v případě mutantů *exo70A1* výraznější akumulaci auxinu v horní části hypokotylu, což zřejmě souvisí s opožděným napřimováním apikálního háčku. Mutanty *exo70A1* mají při klíčení prokazatelný gravitropní defekt - semenáčky se správně orientují až následující den po vyklíčení. Při pracovním pobytu v laboratoři Jiřího Frimla v Gentu byla dále potvrzena námi na úrovni GFP, ale i imunolokalizací opakovaně pozorovaná změna dynamiky přenašečů PIN na mutantním pozadí *exocystu*. Srovnávací analýza transkriptomu sedmidenních a několika týdenních rostlin WT a mutantu *exo70a1* (provedená u Fy. Affymetrix) ukázala na možné souvislosti mutace se změnami metabolismu lipidů a steroidních látek. V současné době čekáme na výsledky paralelní analýzy fytohormonů (materiál je připraven na analýzu na pracovišti ÚEB v Olomouci). (ÚEB+UK)

Připravili jsme několik konstruktů pro expresi fúzí EXO70A1 s GFP/RFP pod přirozeným promotorem EXO70A1 nebo promotorem 35S. Konstrukty s 35S promotorem jsme úspěšně otestovali metodou infiltrace agrobakterií do listů tabáku.

Další práce byla zaměřena na:

- Analýzu mutantů v genech *AtSec8* a *AtExo70A1m*, kde bylo potvrzeno podezření, že *exocyst* se podílí na vývoji myxospermních semenných obalů u *Arabidopsis*. Byly podrobně charakterizovány účinky těchto mutací na ukládání pektinů v průběhu vývoje semen.
- V obdobném smyslu pokračuje i charakterizace interaktoru *exocystu* ROH1, který byl získán z dvouhybridního screeningu a který se rovněž podílí na vývoji semenných obalů.
- Ve spolupráci se Shaulem Yalovským (Univ. Tel Aviv) pokračuje charakterizace příslušníků námi identifikované nové rodiny interaktorů *exocystu* zejména s ohledem na jejich možné interakce s GTPázami rodiny Rop. (UK+zahr)

Dílčí cíl V003 - Plány na rok 2009:

- Hledání souvislosti(i) mezi *exocystem* a polárním transportem auxinů (ÚEB+UK)
- Studium dalších podjednotek *exocystu* - především dosud málo studované podjednotky Exo84 (ÚEB+UK)
- Hledání dalších interaktorů *exocystu* pomocí dvouhybridního systému v kvasince (ÚEB+UK)
- Využití modelu mechu *Physcomitrella patens* pro další studium *exocystu* (ÚEB+UK)
- Studium rostlinného *exocystu* a jeho interaktorů se zaměřením zejména na vývoj semenných obalů (také ve spolupráci s laboratoří Prof. Fowlera podporované MŠMT - KONTAKT) a na funkci námi identifikovaného proteinu Roh1 (ÚEB+UK+zahr)
- Lokalizace isoform PLD $\beta 1$ a δ v rostoucí pylové láčce tabáku, zejména pomocí GFP-fúzních proteinů, respektive protilátek již připravených proti NtPLD δ (ÚEB)

- Analýza dynamiky fosfolipidů během klíčení a růstu pylové láčky, s důrazem na produkty studovaných signálních enzymů (PLD, PC-PLC, PAP, DAGK). Pomocí stejných technik budeme studovat změny hladin signálních fosfolipidů po působení látek zasahujících aktinový a mikrotubulární cytoskelet, endomembránový systém, buněčnou stěnu a tvorbu reaktivních forem kyslíku (ÚEB) (spadá i do dílčích cílů V004 a V005)
- Dokončení studie aktin-vázajících domén u PLD (také příprava přehledné kapitoly o signalizaci v buněčné sekreci rostlin. Charakterizace a analýza PLD na modelu pórku a jejich vlivu na dynamiku cytoskeletu (ÚEB+VŠCHT+zahr) (spadá i do dílčích cílů V004 a V005)
- Podrobnou fylogenomickou analýzu diacylglycerolkinasy v rámci eukaryotické říše (UK)
- Charakterizace linií *Arabidopsis* nesoucích T-DNA inserce v genech pro PLD a PAP, zejména s ohledem na reakci na stresové podmínky - pokračování (UK)
- Komplementace kvasinkového PAP-mutanta tabákovou PAP-cDNA, včetně charakterizace vlivu transformace na složení lipidů pomocí TLC (UK)
- Dokončení bioinformatické studie o evoluci PAP (UK)

Dílčí cíl V004: Charakterizovat struktury cytoskeletu a jejich úlohu v dílčích morfogenních procesech

Studium dynamiky aktinového cytoskeletu v signální dráze SA (spadá také do dílčího cíle V005): V roce 2007 byla prokázána aktivace PI-4 kinasy (po přidavku kyseliny salicylové), vedoucí k významnému nárůstu hladiny fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu (PIP₂), který je mimo jiné modulátorem aktivit PIP₂-dependentních isoform PLD a může regulovat profilin a tak ovlivňovat dynamiku aktinového cytoskeletu. PIP₂ tedy propojuje fosfolipidový signální systém s dynamikou aktinového cytoskeletu. V roce 2008 jsme se tedy zaměřili na úlohu fosfolipidového-cytoskeletálního systému v signální dráze kyseliny salicylové. Byly sledovány změny aktinového cytoskeletu v listech, kořenech a hypokotylech rostlin *Arabidopsis thaliana* exprimujících GFP-FADB2 (fimbrin označený GFP) po ošetření 100 μM, 250 μM nebo 1 mM kyselinou salicylovou (SA). Změny aktinového cytoskeletu byly pozorovány konfokálním mikroskopem v *in vivo* systému. Během nejranější fáze působení (již po několika minutách) SA nastávají změny v organizaci aktinového cytoskeletu. Především v hypokotylech 10ti denních rostlin dochází k rychlé a rozsáhlé depolymeraci aktinu. Tyto výsledky potvrzují fakt, že aktinový cytoskelet by mohl hrát úlohu v signální dráze SA a mohl by stát na počátku kaskády signálních dějů vedoucích k obranným reakcím rostlin. (VŠCHT+UK+ÚEB)

Měření rigidizačního účinku Al³⁺ na membrány rostlinných buněk: Výsledky přispívají k pochopení primárního mechanismu, jímž Al³⁺ ionty indukují zástavu růstu kořene. Jde o řadu jevů, které souvisejí s narušením plazmatické membrány - její rychlou depolarizaci, zvýšení rigidity a inhibici endocytózy. Tekutost plazmatické membrány byla studována *in vitro* měřením generalizované polarizace fluorescenční sondy Laurdan. Aplikace Al-iontů zároveň s látkami zvyšujícími fluiditu membrány měla

za následek částečnou obnovu kořenového růstu. Rukopis publikace je připraven k odeslání mezinárodního vědeckého časopisu v horizontu 2 měsíců. (Schwarzerová, Havelková, Radovan Fišer).

Charakterizace účinků ancymidolu: V rámci studia mechanismů účinku vybraných retardantů na cytoskelet, transport váčků a turnover buněčné stěny v kontextu s morfogenními procesy tabákové linie BY-2 byly dokončeny experimenty, v nichž byl sledován efekt růstového retardantu (anti-giberelinu) ancymidolu na buněčnou expanzi rostlinných buněk. Byl identifikován dosud nepopsaný účinek ancymidolu - inhibice syntézy celulózy, odlišná od mechanismu účinků již známých inhibitorů syntézy celulózy. Ancymidol tedy vedle tradované inhibice *ent*-kauren syntézy (a tedy přímé blokády metabolické dráhy giberelinů) může v různých modelových systémech inhibovat procesy buněčného růstu a morfogeneze i dalšími cestami (Hofmannová et al., J Exp Bot 2008). (UK)

Dílčí cíl V004 - Plány na rok 2009:

- Studium lokalizace a funkce ARP2/3 komplexu v buňkách BY-2 (UK+zahr.)
- Dokončení analýz variability a stability exprese vnesených reportérových genů u buněčných linií tabáku a u bramboru (UK)
- Dokončení analýz úlohy aktinového cytoskeletu v somatické embryogenezi smrku (ovlivnění maturace embryí působením antiaktinových drog) (UK+ÚEB)
- Sledování změn aktinového cytoskeletu ve vybraných T-DNA mutantech a zároveň v suspenzní buněčné kultuře A.t po ošetření kyselinou salicylovou s použitím fluorescenčně značených protilátek (VŠCHT+UK+ÚEB)

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

Vyhledání postupů umožňujících identifikaci a kvantifikaci membránových proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie: Slibný přístup ke kvantifikaci membránových proteinů představuje metoda iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation), v současné době široce užívaná pro kvantifikaci rozpustných proteinů. Principem metody je označení membránových proteinů po specifickém štěpení trypsinem isobarickými značkami, které následně umožní získat představu o jejich kvantitě pomocí hmotnostní spektrometrie. Hlavní výhodou této techniky je možnost modifikovat každý peptid ve směsi vzniklé proteolytickým štěpením proteinů, což dává možnost statistického vyhodnocení naměřených dat. Tuto metodu bychom rádi adaptovali tak, aby byla využitelná i pro relativní kvantifikaci integrálních membránových rostlinných proteinů. (VŠCHT) (Toto téma je zařazeno v plánech na rok 2008 v dílčím cíli V005. Tato kvantifikační metoda by však mohla být také zařazena i do dílčího cíle V003 nebo V004).

Úloha fosfolipidové signální dráhy v morfogenezi rostlinných buněk: Analýzou DNA čipů CATMA byla nalezena skupina 84 genů negativně regulovaných n-butanolem v odpovědi na kyselinu salicylovou (SA). Srovnání těchto genů se skupinou genů reprimovaných v přítomnosti wortmaninu (inhibitor PI4-kinasy) odhalilo souvislost mezi aktivitou PI4-kinasy (PI4-K) a fosfolipasy D (PLD) během odpovědi na SA

(Krinke et al, Plant Physiology, submitted 2008). V předcházejících experimentech (rok 2007) bylo prokázáno, že n-butanol (blokátor tvorby kyseliny fosfatidové produkované fosfolipasou D) specificky blokuje indukcí některých genů regulovaných kyselinou salicylovou (*PR1* gen a *WRKY38* gen) v buněčné suspenzní kultuře *Arabidopsis thaliana*. V souladu s programem prací pro rok 2008 bylo potvrzeno, že indukce těchto genů (*PR1* gen a *WRKY38* gen) je snížena v mutantní linii *pldγ3* (inserčních mutantů T-DNA), což ukazuje na roli této PIP₂-dependentní isoformy PLD v signální dráze kyseliny salicylové (SA). Jako kontrola byl použit nefunkční analog kyseliny salicylové: kyselina 4-hydroxybenzoová, po jehož aplikaci nedochází u divokého typu *Arabidopsis thaliana* k indukcí markerových genů *PR1* a *WRKY38*. Zapojení PIP₂-independentní isoformy PLD (PLDδ, která je závislá na přítavku kyseliny olejové) nebylo v signální dráze SA zatím spolehlivě prokázáno. Byla studována také úloha fosfolipasy C specificky štěpící fosfatidylcholin (PC-PLC) v přenosu signálů brassinosteroidů. Hladina diacylglycerolu (DAG) byla zvýšená již 15 minut po ošetření buněk tabákové linie BY-2 0,1 μM 24-epi-brassinolidem. Mutantní rostliny *A. thaliana* s nefunkčními geny *PCPLC3* a *PCPLC4* ošetřené 0,05 μM brassinolidem se lišily od divokého typu vyšší hustotou laterálních kořenů. Zvýšená aktivita GUS byla pozorována v kořenech, listech a stoncích klíčících rostlin *A. thaliana* *P_{PCPLC3}:GUS* a *P_{PCPLC4}:GUS* po ošetření brassinolidem. Uvedené výsledky, dosažené ve spolupráci s prof. Güntherem Schererem z Hannoverské university, a ukazující na účast PC-PLC v přenosu signálů brassinosteroidů, jsou nyní připraveny k publikaci. (VŠCHT+ÚEB+zahr)

Analýza rodiny fosfolipas D: Byla rozšířena bioinformatická analýza rodiny fosfolipas D (PLD) v eukaryotních organismech, analyzovali jsme výskyt PLD v dalších modelových organismech a vytvořili jsme model 3D struktury katalytického jádra PLD sloužící k predikci sekvenčních motivů s katalytickou či regulační funkcí (ÚEB).

Studium interakce různých isoform fosfolipasy D (PLD) s cytoskeletem in vitro: Pokračovala funkční analýza PLD v pylu tabáku, podařilo se získat kompletní cDNA isoformem NtPLDβ1 a NtPLDδ a parciální sekvenci isoformy NtPLDζ1. Ve spolupráci s VŠCHT jsme připravili ve formě rekombinantních proteinů aktin-vázající domény čtyř různých isoform PLD, pro NtPLDβ1 jsme také připravili několik variant s mutacemi v predikovaných vazebných místech pro aktin. Na základě mnohočetného přiřazení aktin-vázající oblasti PLD totiž usuzujeme, že interakce PIP₂-dependentní PLD s aktinem přes aktin-vázající oblast je zprostředkována pouze několika konservovanými aminokyselinovými zbytky. Pro vazbu by mohly být nezbytné aminokyseliny asparagin (N655 v HsapPLD2) a serin/threonin (S716 v sekvenci HsapPLD2). Pro mutagenézi byl použit postup, při kterém se mutace vnáší pomocí primerů a následné PCR. (VŠCHT+ÚEB)

Vliv isoform PLD na cytoskelet a studium úlohy kyseliny fosfatidové: Ve spolupráci se skupinou Prof. Jana Marca (University of Sydney) jsme provedli studii vlivu isoform PLD na mikrotubulární cytoskelet v buňkách póru zahradního (*Allium porrum*), v současné době je odeslána publikace (New Phytologist). Jelikož kyselina fosfatidová (PA) je v buňce tvořena také alternativní drahou pomocí aktivit fosfolipas C a diacylglycerolkinasy (DAGK), zahájili jsme studium této signální kaskády. Předběžné výsledky farmakologických experimentů se specifickým inhibitorem DAGK naznačily

rozdílnou úlohu PA produkovanou touto drahou v porovnání s PA tvořenou pomocí PLD. Testovali jsme na mikroskopické úrovni CLSM možnosti využití oxonolu pro sledování změn membránového potenciálu v pylu tabáku. Při fluorometrických pokusech se ukázalo, že při masovém měření v kyvetě jsou výsledky při dosavadním postupu neúnosně variabilní. Analýza změn fluorescence oxonolu na jednotlivých láčkách ukazuje, že tento pracovní přístup je slibný. Tato metodika by měla sloužit ke studiu faktorů ovlivňujících membránový potenciál během intenzivní buněčné sekrece – zvl. ve vztahu k aktivitě NADPH oxidáz. (ÚEB+VŠCHT+zahr)

Dále:

- byly klonovány kompletní cDNA dvou nových isoform PLD z *Arabidopsis* (PLDbeta1 a PLDbeta2);
- probíhá genotypování a množení mutantů *Arabidopsis* s T-DNA-insercí ve čtyřech různých isoformách PLD a ve třech genech kódujících PA fosfatázy (PAP); některé geny jsou zastoupeny více inserčními liniemi. Cílem je získat spolehlivý homozygotní materiál (zatím získán pro 1 PAP linii);
- byla rozpracována podrobná bioinformatická analýza PAP genů u eukaryot. Byl získán kvasinkový mutant s defektem PAP, který vykazuje termosensitivní růst a bude využit pro pokusy s komplementací tabákovou cDNA;
- pokračovala charakterizace role PAP *in vivo* v růstu pylové láčky tabáku s využitím inhibitorů fenyglyoxalu a NEM. Byly provedeny předběžné pokusy o vizualizaci aktinového cytoskeletu v rostoucím pylu po ovlivnění inhibitory, a byly provedeny TLC-analýzy lipidů v láčkách ovlivněných inhibitory PAP. Byl rovněž charakterizován vliv inhibice PAP v pylových láčkách tabáku pomocí antisense oligonukleotidů;
- byl připraven konstrukt pro expresi YFP-značeného PAP pod kontrolou pylového promotoru;
- pokusy o přípravu protilátek proti PAP nebyly úspěšné, protože se nepodařilo dosáhnout uspokojivé exprese antigenu v bakteriích zřejmě pro jeho hydrofobní povahu;
- byla testována možnost využití oxonolu jako fluorescenční próby/markeru pro sledování relativních změn membránového potenciálu v suspenzi rostoucích pylových láček tabáku v odpovědi na různá farmakologická ovlivnění. Přes silnou autofluorescenci exiny pylových zrn bylo možno sledovat fluorescenci oxonolu. Variabilita jednotlivých měření je ovšem značná a proto byla prověřena možnost sledovat dynamiku signálu na špičce jednotlivých láček pomocí konfokální mikroskopie. (UK+ÚEB)

Studium účasti PLD v signální dráze cytokininů: Ke studiu byly využity transgenní rostliny *A. thaliana* se zvýšenou expresí genu *ipt* pro biosyntézu cytokininů. Ošetření těchto, díky zvýšenému obsahu cytokininů, zakrslých rostlin n-butanolem, vedlo k částečnému „osvobození“ fenotypu. Rostliny byly větší a měly delší kořeny. Tento výsledek podporuje hypotézu předpokládající účast fosfolipasy D v mechanismu účinku cytokininů. (VŠCHT+ÚEB+MU)

Analýza struktury a funkce proteinů AHP, účastnících se přenosu cytokinového signálu: Exprese a purifikace většiny AHP proteinů ve formě fúzního proteinu s His-kotvičkou byla již dříve úspěšně optimalizována. Protože se však jedná o proteiny, kde je funkční aminokyselinou histidin, rozhodli jsme se pro funkční analýzy připravit proteiny v „čisté formě“, tedy bez jakékoliv fúzní kotvičky. Použitá technologie „gateway“ však ukázala své limity, hlavně co se týká míry exprese. Proteiny byly

produkovány v mnohem menší míře, což se pro purifikaci technikami klasické chromatografie ukázalo být nedostatečné. V současné době klonujeme geny pro AHP proteiny do klasických expresních vektorů. K purifikaci proteinů metodou klasických chromatografií bez fúzních kotviček je potřeba mít detekční systém. K tomu by nám měly sloužit monoklonální protilátky, které jsme připravili (proti AHP2 a AHP5). U rekombinantních AHP proteinů majících fúzní His-kotvičku (AHP1,2,3,5) byly zahájeny práce na optimalizaci krystalizačních podmínek. Nejlepší homogenitu vykazoval protein AHP1, ze kterého se nám podařilo připravit malé krystalky. Pracujeme také na genetické analýze funkce AHP proteinů pomocí analýzy jednoduchých a několikanásobných mutantů. Pro funkční analýzu připravujeme transgenní linie exprimující AHP proteiny v translační fúzi s fluoreskujícími proteiny pod vlastním promotorem. (MU)

Role předpokládané receptorové histidinkinasy CKI1 v regulaci vnímání cytokininů u rostlin, příprava homozygotních linií se sníženou expresí CKI1 a jejich fenotypová analýza: Během roku 2008 jsme prováděli analýzu fenotypu transgenních rostlin se sníženou expresí genu *CKI1*. Provedli jsme analýzu tvorby homodimerů *CKI1 in planta*. Podařilo se prokázat dimerizaci *CKI1* v listech tabáku. V současné době pracujeme na přípravě rukopisu. V roce 2008 byla také ve spolupráci s laboratoří Ildoo Hwanga (Korea) podána přihláška mezinárodního patentu na téma využití genetických modifikací cytokininových receptorů pro regulaci tvorby biomasy u rostlin. (MU+zahr)

Příprava EMS-knihovny pro detekci mutantů se změnou exprese genu CKI1: v roce 2008 jsme dále pracovali na shrnutí dosavadních výsledků a další genetické analýze identifikovaných mutantů. Podařilo se nám získat zajímavého mutantu se změnou exprese *CKI1* a morfologickými i fyziologickými defekty. V současnosti pracujeme na hrubém mapování a další podrobnější analýze jeho fenotypu (citlivost k hormonům, fyziologické změny, atd. (MU)

Analýza struktury a funkce přijímačové domény CKI1 a analýza odpovědí proteomu Arabidopsis na hormonální signály: Pomocí difrakční krystalografie se nám podařilo určit strukturu přijímačové domény *CKI1* (*CKI1_{RD}*) s rozlišením 2 Å. V případě analýzy raných odpovědí proteomu *Arabidopsis* na exogenní cytokininy došlo oproti původnímu plánu ke zpoždění kvůli odchodu Pavlína Kovářové na mateřskou dovolenou. V současné době pracujeme na dokončení výsledků analýz a jejich přípravě k publikaci. (MU)

Analýza interakcí cytokininů a auxinů a jejich role v organogenezi rostlin de novo: V naší další práci jsme pomocí tzv. hypokotylového testu zjistili, že auxiny, nikoliv však cytokininy, jsou schopny indukovat tvorbu nových orgánů (*de novo* organogenezi) v hypokotylových explantátech *Arabidopsis thaliana in vitro*. Zjistili jsme také, že auxiny indukují tvorbu endogenních cytokininů, které pak ovlivňují tvorbu auxinových maxim prostřednictvím regulace exprese auxinových přenašečů z rodiny PIN a podstatným způsobem tak ovlivňují organogenezi rostlin. Zjistili jsme také, že tyto mechanismy se uplatňují i v regulaci růstu kořene *Arabidopsis*. Tyto poznatky zásadním způsobem přispívají k porozumění vzájemné interakce cytokininů a auxinů během vývojových programů řídících morfogenezi rostlin. Naše výsledky byly přijaty k publikaci v *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* (Pernisová et al., PNAS 2009). (MU+ÚEB)

Studium interakce cytokininů a světla v regulaci morfogeneze u Arabidopsis thaliana: Byla provedena analýza vlivu zvýšení endogenních hladin cytokininů na vývoj semenáčků *Arabidopsis thaliana* kultivovaných ve tmě. Bylo zjištěno, že již velmi nízké zvýšení hladin endogenních cytokininů je dostačující pro iniciaci částečné fotomorfogeneze ve tmě. Srovnání provedené proteomické analýzy této částečné fotomorfogeneze indukované cytokininy s dříve publikovanými transkriptomickými studiemi fotomorfogeneze indukované světlem vedlo k identifikaci genů, které jsou regulovány shodně oběma stimuly (Lochmanová et al., J. Exp. Bot. 2008). (MZLU+MU)

Vývoj reálných antagonistů cytokininů působících na receptorové úrovni: Byl připraven a testován purinový derivát PI-55. Následně byla popsána schopnost této látky blokovat vazbu přirozeného ligandu (cytokininu) do vazebného místa cytokininových receptorů AHK3 a CRE1/AHK4 a blokovat tak percepci a následně transdukci cytokininového signálu. Genetické a biochemické přístupy ukázaly, že primárním cílem tohoto antagonisty je receptor CRE1/AHK4, což bylo potvrzeno na úrovni *in vivo* pozorováním fenotypů typických pro rostliny se sníženou percepcí cytokininů. Rostliny ošetřené látkou PI-55 měly zkrácenou dobu klíčení a zvětšený kořenový systém. Anti-cytokininová aktivita látky PI-55 byla dále potvrzena v různých cytokininových biotestech (Spíchal et al., FEBS J 2009). (ÚEB+zahr.)

Studium interakcí signálních faktorů hormonálních (cytokininy, auxiny, gibbereliny) a non-hormonálních (cukry): Regulační mechanismy morfogeneze hlíz byly studovány na modelové mutantní linii bramboru s vysokou tendencí k tvorbě hlíz i za neindukčních podmínek. Provedené analýzy ukázaly, že klíčovou roli v procesu tvorby hlíz hrají nejen interní hladiny sacharidů, ale zejména jejich relativní dostupnost a celkový redoxní stav rostliny. Chování mutantní linie dále ukázalo, že silné negativní regulátory tuberizace, gibbereliny, nejsou centrální jednotící složkou mnohočetných signálních drah vedoucích k indukci tvorby hlíz, ale jejich inhibiční účinek spočívá v blokování vlastního morfogenetického procesu přeměny podzemního stonku, stolonu, v hlízu (Fischer et al., BMC Plant Biology 2008). (UK+zahr.)

Charakterizace programované buněčné smrti u rostlin: Důležitým faktorem morfogeneze rostlinných pletiv a orgánů a současně klíčovým mechanismem reakcí rostlin na biotický a abiotický stres je programovaná buněčná smrt (PCD). Analýzy indukčních faktorů a možností detekce PCD prováděné zejména na modelové linii BY-2 přinesly velmi zajímavé zjištění vedoucí k nutnosti částečného přehodnocení dostupných literárních údajů o PCD u rostlin. I v intaktních rostlinných buňkách je totiž přítomen kompletní enzymatický aparát vedoucí po mechanické desintegraci buněk k rychlé degradaci buněčného obsahu. Tato degradace je doprovázena internukleosomální fragmentací genomové DNA, jež byla dosud považována za typický symptom apoptotické PCD (Kuthanová et al., J Exp Bot 2008). Indukce PCD závisí kromě mnoha jiných faktorů i na fázi buněčného cyklu, v níž se rostlinná buňka nachází v okamžiku působení indukčního signálu. Srovnáním literárních údajů s výsledky získanými při indukci PCD ionty kadmia jasně ukázaly, že jednotlivé indukční dráhy se v tomto ohledu velmi významně odlišují. Narozdíl od PCD indukované patogeny či fytohormony (např. při diferenciaci tracheálních elementů), po působení ionty kadmia zřejmě dochází k aktivnímu blokování indukce PCD v buňkách nacházejících se v G1-fázi buněčného cyklu (Kuthanová et al. Plant Cell Environ 2008). Tyto výsledky

budou mj. využity v dalším studiu úlohy různých cytoskeletálních struktur v morfogenezi související s PCD (**UK+zahr.**)

Dílčí cíl V005 - Plány na rok 2009:

- Zavedení metody isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) pro relativní kvantifikaci membránových rostlinných proteinů. Zaměříme se na optimalizaci přípravy vzorku pro měření hmotnostní spektrometrií. (**VŠCHT**)
- Lokalizace isoformů PLD $\beta 1$ a δ v rostoucí pylové láčce tabáku, zejména pomocí GFP-fúzních proteinů, respektive protilátek již připravených proti NtPLD δ . (**ÚEB**)
- Analýza dynamiky fosfolipidů během klíčení a růstu pylové láčky, s důrazem na produkty studovaných signálních enzymů (PLD, PC-PLC, PAP, DAGK) - viz dílčí cíl V003
- Dokončení studia přímé interakce připravených rekombinantních GST-fúzních proteinů s aktinem (publikace výsledků) (**VŠCHT+ÚEB**)
- Dokončení studie aktin-vázajících domén u PLD (také příprava přehledné kapitoly o signalizaci v buněčné sekreci rostlin. Charakterizace a analýza PLD na modelu póru a jejich vlivu na dynamiku cytoskeletu (**ÚEB+VŠCHT+zahr**) (spadá i do dílčích cílů V004 a V005)
- Podrobnou fylogenomickou analýzu diacylglycerolkinasy v rámci eukaryotické říše (**UK**)
- Charakterizace linií *Arabidopsis* nesoucích T-DNA inserce v genech pro PLD a PAP, zejména s ohledem na reakci na stresové podmínky - pokračování (**UK**)
- Komplementace kvasinkového PAP-mutanta tabákovou PAP-cDNA, včetně charakterizace vlivu transformace na složení lipidů pomocí TLC (**UK**)
- Dokončení bioinformatické studie o evoluci PAP (**UK**)
- Analýza dynamiky fosfolipidů během klíčení a růstu pylové láčky, s důrazem na produkty studovaných signálních enzymů (PLD, PC-PLC, PAP, DAGK) - viz dílčí cíl V003
- Příprava a charakterizace dvojitých mutantů *PC-PLC* T-DNA u *A. thaliana* (**ÚEB**)
- Studium účasti PLD v signální dráze cytokininů - pokračování (**ÚEB+VŠCHT+MU**)
- Dokončení prací na analýze raných odpovědí proteomu *Arabidopsis* na cytokininové působení (**MU**)
- Dokončení strukturní analýzy přijímačové domény CKI1 (**MU**)
- Genetické a molekulárně-biologické studie funkcí proteinů AHP při přenosu cytokininového signálu (struktura AHP proteinů a její význam v determinaci specifity cytokininových signálních drah) - pokračování (**MU**)
- Genetická analýza mutantů se změnou exprese *CKI1* - pokračování (**MU**)
- Studium interakce cytokininů a světla v regulaci morfogeneze u *Arabidopsis thaliana* - pokračování (**MZLU**)

- Pokračování ve vývoji nových cytokininových antagonistů, jejichž mechanismem účinku je blokování percepce cytokininů a studium jejich účinku *in vivo* na fenotyp hospodářsky významných rostlin, především účinku na klíčení semen (ÚEB)
- Analýzy funkce hybridních prolinem-bohatých proteinů u buněčné suspenze tabáku BY-2 a bramboru (UK)
- Ověření potenciální úlohy jaderného skeletu ve stresové - morfogenní reakci tabákových buněčných linií (UK)

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

Biosyntéza cytokininů v modelovém materiálu - mechu Physcomitrella patens: Pomocí LC-MS analýzy byl porovnán obsah a zastoupení cytokininů v pletivech mutantních rostlin nadprodukujících cytokininy s obsahem a zastoupením cytokininů v tRNA těchto mečů. Výsledky ukazují na přítomnost a podobné procentuelní zastoupení cytokininů, především *cis*-zeatinového typu v obou vzorcích. Toto zjištění, společně se skutečností, že *P. patens* disponuje pouze tRNA-IPT (PpIPT1), potvrzuje hypotézu, že u tohoto mechu je hlavním mechanismem biogeneze cytokininů jejich uvolnění z degradované tRNA. Toto tvrzení také dokládá fakt, že *PpIPT1* gen je ve zvýšené míře exprimovaný v cytokininy-nadprodukujícím mutantovi za indukčních podmínek, stejně jako v cytokinin-deficientním mutantovi exprimujícím *AtCKX2* (Yevdakova et al. J Plant Growth Regul 2008). (ÚEB+zahr)

Metabolické dráhy a fyziologické účinky cis-zeatinu: U zvolených modelových rostlin s vysokým obsahem derivátů *cis*-zeatinu (oves, tabák) byly studovány metabolické dráhy a fyziologické účinky tohoto cytokininu. S použitím radioaktivně značeného [³H]*cisZ* byly zjištěny výrazné rozdíly jeho metabolismu u obou rostlinných materiálů; v souladu s výsledky analýz endogenních CK byly v listech ovsa detekovány *cisZ*-*O*-glukosidy a v listech tabáku *cisZ*-*N7*-glukosidy jako převažující tritiované metabolity aplikovaného [³H]*cisZ*. Metabolismus [³H]*cisZ* se u ovsa i tabáku značně lišil od metabolismu [³H]*transZ*, shodně však byla v případě obou isomerů zjištěna poměrně intenzivní degradace na adenin/adenosin, která byla potvrzena i stanovením vysoké aktivity CKX v testech *in vitro* (Gajdošová et al. 2008 - abstrakt). (ÚEB)

Charakterizace vztahu mezi aktivitou cytokininoxidázy/dehydrogenázy a morfogenezí: V *AtCKX*-transformovaných rostlinách bramboru pěstovaných v podmínkách *in vitro* bylo zjištěno zvýšení aktivity cytokininoxidázy/dehydrogenázy (CKX) vedoucí k redukci obsahu endogenních cytokininů (CK) a následně k ovlivnění specifických morfogenních procesů. Transgenní CK-deficitní rostliny vykazovaly široké spektrum fenotypových změn včetně zkrácení výhonů, iniciace tvorby stolonů a vyšší produkce hlíz. U kontrolních i *AtCKX*-transformovaných rostlin byl zaznamenán výrazný účinek exogenně aplikované IAA na změny poměrných koncentrací CK a auxinů a v důsledku vychýlení hormonální rovnováhy ve prospěch auxinů též na jejich morfogenezi (stimulace tvorby kořenů, u transformantů mírná inhibice tuberizace; Dragičević et al. 2008 - abstrakt). V pravokořených *AtCKX*-

transformovaných rostlinách tabáku fenotypové změny vyvolané zvýšenou aktivitou CKX a snížením obsahu CK zahrnovaly zejména zpomalení vývoje a oddálení senescence a byly spojeny též se zvýšením aktivity antioxidačního systému (Mýtinová et al., rukopis odeslán).

Charakterizace vztahu mezi aktivitou cytokininoxidázy/dehydrogenázy a senescencí: Byla prokázána závislost rychlosti senescence (stárnutí) zatemněné dělohy tykve na světelném režimu protistojné párové dělohy. Výrazné zvýšení rychlosti senescence charakterizované změnami struktury děloh, narušením ultrastruktury chloroplastů, snížením rychlosti fotosyntézy a aktivity PSII bylo zjištěno po působení tmy na obě dělohy. Současně byl v obou dělohách silně snížen obsah cytokininů a auxinu. Při zatemnění pouze jedné z děloh bylo snížení hladin CK a auxinu v zatemněné děloze mnohem mírnější. Je zřejmé, že rychlost senescence indukovaná působením tmy na jednu z děloh je závislá na světelném režimu druhé z obou děloh. Positivní korelace poklesu endogenních CK a aktivity CKX svědčí o účasti tohoto enzymu v mechanismech regulujících progres senescence v individuálně zatemněných dělohách (Ananieva et al., *Physiol Plant* 2008).

Vztah mezi metabolismem cytokininů a stresem: Byla stanovena exprese všech genů pro biosyntézu volných cytokininů (*AtIPT*) a všech genů pro cytokininoxidázy/dehydrogenázy (*AtCKX*) v apexu, listech růžice a kořenech *Arabidopsis thaliana* za kontrolních kultivačních podmínek a během teplotního stresu (40°C po 0,5, 2 a 6 hodinách). Nejvíce exprimovaná byla *AtIPT3*. Je zajímavé, že její nejvyšší expresi jsme zaznamenali v kořenech a relativně nejnižší v apexu, kde ovšem byl zdaleka nejvyšší obsah bioaktivních cytokininů. Z genů pro CKX byla nejvyšší exprese v apexu a v listech zjištěna u *AtCKX5* a *AtCKX6*. Výše zmíněné geny byly lokalizovány především ve floému. Získané výsledky naznačují jak důležitost transportu cytokininů cévními svazky, tak existenci velmi efektivních mechanismů regulace jejich hladin v průběhu tohoto transportu. (ÚEB)

Porovnání účinku n-butanolu a metyl-2-propanolu na hladiny cytokininů v suspensi BY-2: Pokud byly oba alkoholy aplikovány na počátku kultivace, došlo k poklesu růstu a dělení buněk, korelujícímu se snížením hladiny bioaktivních cytokininů. Tento pokles byl výraznější v případě n-butanolu, kompetitivního inhibitoru fosfolipázy D. Pokud byl alkohol přidán až v exponenciální fázi, došlo po aplikaci n-butanolu k poklesu jak bioaktivních cytokininů, tak jejich prekursorů – fosfátů cytokininů. V případě isobutanolu byl pozorován naopak nárůst. Zřejmě se jedná o aktivaci metabolismu působením mírného stresu. Přítomnost stresu je indikována snížením nárůstu biomasy. (ÚEB+VŠCHT) (spadá i do dílčího cíle V005)

Analýza interakcí mezi endogenními hladinami cytokininů a tvorbou lokálních auxinových maxim během vývoje kořene u Arabidopsis : Na počátku roku se nám podařilo publikovat první výsledky naznačující možnou interakci mezi hladinami endogenních cytokininů a distribucí auxinů během vývoje kořene u *Arabidopsis* (Kuderová et al., *Plant Cell Physiol* 2008). Zjistili jsme, že hladina endogenních cytokininů se mění během prvních dní vývoje hlavního kořenového meristému a že se také mění citlivost k hladinám endogenních cytokininů. Tyto výsledky ukázaly na možný vliv endogenních cytokininů na distribuci auxinů během vývoje rostlin a byly dále rozpracovány v navazující publikaci (Pernisová et al., viz výše - dílčí cíl V005). (MU+ÚEB)

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): Byly získány nové poznatky o úloze klastru hydrofobních aminokyselinových zbytků F193-F200-W373-F461 v molekulární determinaci enzymatické účinnosti β -glukozidázy Zm-p60.1, která uvolňuje aktivní formy cytokininů z jejich zásobních forem - O-glukozidů. Bylo prokázáno, že zbytky F193 a W373 přispívají klíčovou měrou jak k determinaci specifity vůči aglykonové části substrátu, tak k výši čísla přeměny enzymu. Vliv W373 na číslo přeměny nebyl dříve popsán. Bylo ukázáno, že F193 minimalizuje vazbu substrátu k enzymu v neproduktivním modu a s tím spojenou inhibici enzymatické aktivity molekulou substrátu (Dopitová et al., FEBS J, 2008). (MZLU+MU)

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): Byl podrobně charakterizován vliv současné ektopické exprese Zm-p60.1 směřované do chloroplastů a vakuoly v transgenních rostlinách tabáku. Probíhá konstrukce transgenních rostlin umožňujících expresi nativní chloroplastové chimérické vakuolární verze Zm-p60.1 v *Arabidopsis thaliana*. (MZLU+ÚEB)

Nové strukturní deriváty cytokininů: Byly připraveny nové strukturní deriváty cytokininů odvozené od 6-anilinopurinu a byla popsána jejich schopnost inhibovat aktivitu klíčového enzymu degradace cytokininů cytokininoxidázy/dehydrogenázy (CKX) s o řád silnější účinností, než-li dosud známe inhibitory CKX, jako např. thidiazuron. Na 19 nově připravených látkách byla provedena studie vztahu mezi jejich strukturou a aktivitou. Dále byla studována schopnost těchto látek aktivovat cytokininovou signální dráhu skrze receptory AHK3 a CRE1/AHK4 a aktivita v klasických cytokininových biotestech (Zatloukal et al., Bioorg. Med. Chem. 2008). (ÚEB)

Dílčí cíl V007 - Plány na rok 2009:

- Dokončení experimentů, v nichž bude sledován vliv zvýšené exprese CKX genu (AtCKX1, 2) na změny v hormonální rovnováze a specifikován vztah k fenotypu rostlin; stanovení a porovnání účinku exogenně aplikovaných bioaktivních látek (CK, auxiny aj.) na morfogenezi a stárnutí v kontrolních rostlinách a rostlinách se sníženou hladinou CK (AtCKX; brambor, tabák) (ÚEB)
- Prověření biologických účinků CK typu *cis*- a *trans*-zeatinu (vliv na morfogenezi, senescenci, buněčné dělení), specifikace metabolických drah a zhodnocení fyziologického významu těchto látek v rostlinách (ÚEB)
- Dokončení studie vlivu teplotního stresu na *A. thaliana* (dynamika aktivity CKX, kvantifikace exprese genů pro fosfolipasy v průběhu teplotního stresu) (ÚEB) (spadá i do dílčího cíle V005)
- Ověření účinků n-butanolu a isobutanolu na hladiny cytokininů v suspenzi buněk BY-2 (ÚEB+VŠCHT) (spadá i do dílčího cíle V005)

- Vyhodnocení vlivu stimulace exprese *SHO* a *IPT* na hladiny endogenních cytokininů (ÚEB+MZLU)
- Studium potenciální funkce CK v komunikaci mezi dělohami a primárními listy tykve v rámci sledování hormonálně zprostředkovaných komunikací mezi orgány rostlin při lokální indukcí senescence působením tmy (ÚEB)
- Studium účinku *in vivo* inhibitorů cytokininoxidázy/dehydrogenázy, připravených v předchozím roce, na fenotyp hospodářsky významných rostlin (ÚEB)
- Purifikace rekombinantních isopentenyltransferáz z *Arabidopsis thaliana* pro biosyntézu cytokininů *de novo*, studium jejich substrátové specifity a vývoj inhibitorů biosyntézy cytokininů (ÚEB)
- Výzkum modulace substrátové specifity u β -glukosidázy Zm-p60.1 pomocí racionálního designu a řízené evoluce s cílem identifikovat funkční klastry aminokyselin v pozicích zajišťujících interakci s cytokininy (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)

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

- Pro vláknově-optické (mikro)sondy pH byly připraveny vláknové tapery o nejmenším průměru špičky 3 μ m s dobrými mechanickými vlastnostmi. (ÚFE)
- Na kvalitní čela vláknových taperů (opracovaná CO₂ laserem) byl imobilizován pomocí metody sol-gel převodník pro detekci pH (BCECF), který zaručuje limit detekce 0,1 pH v rozsahu pH od 5 do 7. (ÚFE)
- Pomocí taperovaných vláken byla naměřena optická odezva na změnu pH v rozsahu <5; 7> z mikroskopických preparátů buněčné kultury. (ÚFE)
- Byly provedeny předběžné experimenty s vyvinutými iontově-selektivními antimonovými mikroelektrodami, které by potenciálně mohly být alternativním řešením detekce intracelulárního pH. (ÚFE)
- V rámci spolupráce s ÚEB (Dr.Petrášek) byla vyvinuta originální metoda pro charakterizaci distribuce fluorescentních dopantů ve skelných maticích optických vláken (preforem) pomocí konfokální mikroskopie. (ÚFE+ÚEB)

Dílčí cíl V006 - Plány na rok 2009:

- Navrhnout a připravit taperované vláknové detekční elementy s pokryvem tenké ochranné metalické vrstvy (ÚFE)
- S pomocí připravených jedno- nebo mnoho-vidových komponent realizovat optickou sestavu pro měření pH s jemným prostorovým rozlišením (ÚFE)

- Testovat vláknově-optickou a alternativně elektrochemickou detekci na buněčných kulturách s cílem dosažení co nejlepší citlivosti (ÚFE+ÚEB).

3. Personální zajištění (zmíněny pouze změny)

ÚEB: K řešitelskému týmu se přidala nově nastoupivší postgraduální studentka - ing. Eva Žižková. Mgr. Adrianu Jelínkovou-Černou po jejím odchodu na mateřskou dovolenou nahradil RNDr. Jiří Libus, Ph.D. Od září 2008 nastoupila do týmu Mgr. Hana Lukšanová, PhD.

UK: Mzda doktoranda Mgr. Ivana Kulicha byla v r. 2008 financována z institucionálních prostředků (výzkumný záměr), ale na řešení problematiky Centra se nadále podílí. Úvazek původně plánovaný pro Mgr. Jindřišku Fišerovou, Ph.D. byl po přechodném zaměstnání dvou studentů PGS, Mgr. Lenky Dvořákové a Mgr. Miroslava Srby, uvolněn pro přijetí nové pracovnice ing. Yvetty Šefrnové, nezatížené dalšími studijními povinnostmi (její nástup se z rodinných důvodů posunul až na leden 2009).

MU: V porovnání s koncem roku 2007 došlo v roce 2008 k několika změnám. Pavlína Kovářová odešla na mateřskou dovolenou, naopak se platným členem týmu stal Jakub Horák, který se okamžitě po svém příchodu zapojil do plnění výzkumných úkolů Centra. Martina Válková je dlouhodobě nemocná, proto byla na její místo přijata Romana Dobešová.

VŠCHT: Ing I. Duží odešla k 31.12. 2007. Na její místo byla přijata na dva měsíce (leden -únor 2008) Bc. Hana Navarová. 1.3. 2008 nastoupila místo ní Ing. Barbora Jindřichová, která odešla k 31.8. 2008. PharmDr. Jindřiška Matoušková nastoupila 1.9. 2008.

MZLU: žádné změny

ÚFE: Činnost ukončili : Jana Skokánková-Proboštová - úvazek hrazený ze zdrojů mimo Centrum - z důvodu mateřské a rodičovské dovolené a Petr Tobiška - úvazek hrazený ze zdrojů mimo Centrum z důvodu organizačního přeřazení. Jeho práci převezme Tomáš Martan.

4. Mezinárodní spolupráce; nové i již dříve navázané, které aktivně pokračují

Nové spolupráce:

- Univ. of Bern, Švýcarsko; Prof. Cris Kuhlemeier, mechanismus polárního transportu auxinu (ÚEB)
- Univ. of Leeds; Dr. Andrew Cuming a David Cove, experimentální využití modelu mechu *Physcomitrella patens*. (ÚEB, UK)
- Univ. Tel Aviv, Izrael; skupina S. Yalovského (UK)
- IPK Gatersleben, Německo; Dr. Udo Conrad (MU)
- VIB, University of Ghent, Belgie; Dr. Geert De Jaeger (MU)
- VIB, University of Ghent, Belgie; Dr. Tom Beeckman (MU)
- Imperial College of London, Velká Británie; Dr. Colin Turnbull - spolupráce v rámci doktorské práce N. Young - lokalizace PIN1 při studiu apikální dominance u *rms* mutantů hrachu. Výměna experimentálního materiálu (MZLU)

- University Pecs - Pecs, Maďarsko; elektrochemická detekce pH (mikroelektrody) (ÚFE)

Pokračující spolupráce:

- VIB, Department of Plant Systems Biology, Ghent University, Belgie; Prof. Jiří Friml a Dr. Eva Benková; polární transport auxinu; probíhá vzájemná výměna experimentálního materiálu, společné publikace (ÚEB, UK, MU, MZLU)
- Univ. of Hannover, Německo; Prof. Günther Scherer: v přípravě je společná publikace - Rinukshi Wimalasekera, Přemysl Pejchar, André Holk, Jan Martinec, and Günther F. E. Scherer: A plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C with roles in root development and brassinolide signaling in *Arabidopsis thaliana* (ÚEB)
- Horticulture Research International/University of Warwick, Wellesbourne, Velká Británie; Prof. Richard M. Napier; problematika receptorů pro auxiny a transportu auxinů, společné publikace (ÚEB)
- Plant Science Department, University of Connecticut, Storrs, CT, USA; Prof. Richard McAvoy.
- University of Kwazulu-Natal, Research Centre for Plant Growth and Development, Jižní Afrika; Prof. Johannes Van Staden: Nové růstové látky rostlin (ÚEB)
- Purdue University, Dept. of Horticulture, West Lafayette, USA; Prof. Angus Murphy a Wendy Peer: Mechanismus transportu auxinu, výměna experimentálního materiálu a společná publikace (ÚEB)
- Univ. Ghent, Faculty of Science, Ghent, Belgie; Prof. Dominique Van Der Straeten: Přenos a „cross-talk“ hormonálních signálů. (ÚEB)
- Institute for Biology/Applied Genetics, Free University in Berlin, Německo (ÚEB)
- Biocenter Klein Flottbek and Botanical Garden, University of Hamburg, Německo (ÚEB)
- University of Belgrade, Faculty of Biology (Dr. I. Dragičević) and Institute for Biological Research (Dr. S. Ninković), Bělehrad, Srbsko: morfologické vlastnosti a metabolismus fytohormonů v transgenních rostlinách bramboru exprimujících *AtCKX* geny (ÚEB)
- Institute of Plant Sciences, ETH Zurich, Switzerland (prof. W. Gruissem) : exprese isopentenyltransferas v rostlinných buňkách a její fyziologické projevy (ÚEB)
- Institute of Plant Physiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofie, Bulharsko (Dr. K. Ananieva): metabolismus cytokininů a exprese genů v průběhu indukované senescence a následném zotavení v dělohách tykve - Prioriní projekt dvoustranné smluvní spolupráce mezi Bulharskou akademií věd a AV ČR (ÚEB)
- Oregon State University, USA; laboratoř J. Fowlera, spolupráce podporovaná rovněž grantem v rámci programu KONTAKT (ÚEB, UK)
- University of Sydney, Austrálie; Dr. Jan Marc, fosfolipasa D a cytoskelet (ÚEB, UK)
- Universität Karlsruhe, Botanisches Institut 1, Německo, Prof. Peter Nick, spolupráce při výzkumu cytoskeletu a programované buněčné smrti; probíhá vzájemná výměna experimentálního materiálu; společné publikace (UK)
- Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Agricultural and Forest Biotechnologies, Dr. Jean-François Hausmann, metodická spolupráce na úrovni proteomických analýz; společné publikace (UK)
- Pohang University of Science and Technology, Korea; Prof. Ildoo Hwang (MU)
- Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6/CNRS, FRE 2846 (VŠCHT)

5. Publikované práce

5.1 Články v impaktovaných časopisech *(uvedeny abecedně podle prvního autora)*

Ananieva K, Ananiev ED, Doncheva S, Georgieva K, Tzvetkova N, Kamínek M, Motyka V: Dobrev P, Gajdošová S, Malbeck J.: Senescence progression in a single darkened cotyledon depends on the light status of the other cotyledon in *Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings: potential involvement of cytokinins and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity. - *Physiol. Plant.* 134: 609-623, 2008. (ÚEB+zahr)

IF = 2.192

Benková, E. and Hejátko, J. (2008) Hormone interactions at the root apical meristem, *Plant Molecular Biology*, DOI 10.1007/s11103-008-9393-6. (MU+zahr)

IF₂₀₀₇ = 3.847

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.* 105: 4489-4494, 2008 (ÚEB+zahr)

IF = 9.598

Dopitová, R., Mazura, P., Janda, L., Chaloupková, R., Jeřábek, P., Damborský, J., Filipi, T., Kiran, N.S., Brzobohatý, B.: Functional analysis of the aglycone-binding site of the maize β -glucosidase Zm-p60.1. - *FEBS J* 275: 6123-6135, 2008 (MZLU+MU)

IF₂₀₀₇ = 3.396

Fischer L, Lipavská H, Hausman JF, Opatrný Z (2008) Morphological and molecular characterization of a spontaneously tuberizing potato mutant: an insight into the regulatory mechanisms of tuber induction. - *BMC Plant Biology* 8: 117, 2008 (UK+zahr.)

IF = 3.232

Fischerová L, Fischer L, Vondráková Z, Vágner M: 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* 27:435-441, 2008 (ÚEB+UK)

IF = 1.974

Galichet A*, Hoyerová K*, Kamínek M, Gruissem W: Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. - *Plant Physiol* 146: 1155-1164, 2008 (*joint first authors) (ÚEB+zahr)

IF = 6,125

Hála M, Cole R, Synek L, Drdová E, Pečenková T, Nordheim A, Lamkemeyer T, Madlung J, Hochholdinger F, Fowler JE, Žárský V: An exocyst complex functions in plant cell growth in *Arabidopsis* and tobacco. - *The Plant Cell* 20: 1330-1345, 2008 (ÚEB+UK+zahr)

IF = 9.65

- 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 Environment* 31: 341-353, 2008 (ÚEB)
IF = 4.497
- Hofmannová J., Schwarzerová K., Havelková L., Boříková P., Petrášek J., Opatrný, Z. A novel, cellulose synthesis inhibitory action of ancymidol impairs plant cell expansion. - *J Exp Bot* 59(14): 3963-3974, 2008 (UK)
IF = 3.917
- 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 Physiol.* 146: 1128-1141, 2008 (UK+zahr.)
IF = 6,125
- Kuderová, A., Urbánková, I., Váľková, M., Malbeck, J., Brzobohatý, B., Némethová, D., and Hejátko, J.: Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of *Arabidopsis* seedlings. - *Plant Cell Physiol* 49: 570-582, 2008 (MU+MZLU)
IF₂₀₀₇ = 3.654
- Kuthanová A, Fischer L*, Nick P, Opatrný O (2008) Cell cycle phase-specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. - *Plant Cell Environ* 31:1634-1643, 2008 (UK+zahr)
IF = 4.497
- Kuthanová A, Opatrný Z, Fischer L Is internucleosomal DNA fragmentation an indicator of programmed cell death in plant cells? - *J Exp Bot* 59: 2233-2240, 2008 (UK)
IF = 3.917
- Lochmanová, G., Zdráhal, Z., Konečná, H., Koukalová, Š., Malbeck, J., Souček, P., Váľková, M., Kiran, N.S., Brzobohatý, B.: Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown *Arabidopsis*: a proteomic analysis. - *J Exp Bot* 59: 3705-3719, 2008 (MZLU+MU)
IF₂₀₀₇ = 3.917
- Mravec J, Kubeš M, Bielach A, Gaykova V, Petrášek J, Skupa P, Chand S, Benková E, Zažímalová E, and Friml J: Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. - *Development* 135: 3345-3354, 2008 (ÚEB+zahr)
IF = 7.293
- Oulehlová, D., Hála, M., Potocký, M., Žárský, V., Cvrčková, F. (2009). Plant antigens cross-react with rat polyclonal antibodies against KLH-conjugated peptides. - *Cell Biol. International* 33: 113-118 (v tisku 2009, již dostupné online) (ÚEB+UK)
IF = 1.547
- Pernisová M, Klíma P, Horák J, Váľková M, Malbeck J, Souček P, Reichman P, Hoyerová K, Dubová j, Friml J, Zažímalová E, Hejátko J: Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, accepted 2009 (MU+ÚEB)
IF = 9.598
- Spíchal, L., Werner, T., Popa, I., Riefler, M., Schmülling, T., Strnad, M. The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. - *FEBS J* 276: 244-253 (2009) (ÚEB+zahr)

IF = 3.396

von Rad U, Klein I, Dobrev PI, Kottova J, Zazimalova E, Fekete A, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P and Durner J: Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. - *Planta* 229: 73-85, 2008 (ÚEB+zahr)

IF = 3.058

Yevdakova, N.A., Motyka, V., Malbeck, J., Trávníčková A., Novák, O., Strnad, M., von Schwartzberg, K. Evidence for Importance of tRNA-Dependent Cytokinin Biosynthetic Pathway in the Moss *Physcomitrella patens*. - *J Plant Growth Regul* 27: 271-281, 2008 (ÚEB+zahr)

IF = 2.220

Zatloukal, M., Gemrotová, M., Doležal, K., Havlíček, L., Spíchal, L., Strnad, M. Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. - *Bioorg Med Chem*. 16, 9268-9275 (2008) (ÚEB)

IF = 2.662

Článek v časopisu, kterému bude IF přiřazen v nejbližší době:

Kuderoová, A. and Hejácíko, J.: Spatiotemporal aspect of cytokinin-auxin interaction in hormonal regulation of the root meristem. - *Plant Signaling and Behavior*, 4, in press 2009 (MU)

5.2 Patenty:

Udělení:

Karel Doležal, Igor Popa, Jan Holub, René Lenobel, Stefaan Werbrouck, Miroslav Strnad, Marek Zatloukal. Heterocyclic compounds based on N6-substituted adenine, methods of their preparation, their use for preparation of cosmetic preparations and cosmetic preparations containing these compounds. Applicant: **Ustav experimentální botaniky Akademie Ved CR, Rozvojová 35, 165 02 Praha 6, Lysolaje, CR**; Místo udělení: **Singapore**; Datum udělení: **30/9/2008**; Číslo patentového spisu: **119228** (ÚEB+zahr)

Karel Doležal, Igor Popa, Jan Holub, René Lenobel, Stefaan Werbrouck, Miroslav Strnad, Marek Zatloukal. Heterocyclic compounds based on N6-substituted adenine, methods of their preparation, their use for preparation of cosmetic preparations and cosmetic preparations containing these compounds. Applicant: **Ustav experimentální botaniky Akademie Ved CR, Rozvojová 35, 165 02 Praha 6, Lysolaje, CR**; Místo udělení: **Australia**; Datum udělení: **22/5/2008**; Číslo patentového spisu: **AU2002363362** (ÚEB+zahr)

Karel Doležal, Igor Popa, Jan Holub, René Lenobel, Stefaan Werbrouck, Miroslav Strnad, Marek Zatloukal. COMPUESTOS HETEROCICLICOS EN BASE A ADENINA EN N6, METODOS PARA SU PREPARACION, SU USO PARA LA PREPARACION DE DROGAS, PREPARACIONES, COSMETICAS Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO, PREPARACIONES FARMACEUTICAS, PREPARACIONES COSMETICAS Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO QUE CONTIENEN ESTOS COMPUESTOS. Applicant: **Ustav experimentální botaniky Akademie Ved CR, Rozvojová 35, 165 02 Praha 6, Lysolaje, CR**; Místo udělení: **Mexico**; Datum udělení: **9/4/2008**; Číslo patentového spisu: **MX 256139** (ÚEB+zahr)

Přihláška:

Hejatkó J, Hwang I, Dobesová R, Ryu H, Dubová J: Method of regulation of biomass production in plants, DNA sequences and methods of preparation thereof. - International patent, appl. no.: PCT/CZ2008/000075, international publication no.: WO 2009/003429 A2. International Filing Date 2/8/2008, International Publication Date 8/1/2009, International application published under the Patent Cooperation Treaty (PCT).
(MU+zahr)

5.3 Kapitoly v knihách

Žárský V, Fowler J. ROP (Rho-Related Protein from Plants) GTPases for Spatial Control of Root Hair Morphogenesis. In A-M Emons, T. Ketelaar (eds.), "Root Hairs" Plant Cell Monographs Vol. 12, Heidelberg, Springer-Verlag, p. 191-209, 2008 (ÚEB+UK+zahr)

Binarová Pavla, Cenklová Věra, Pochylová Žaneta., Dráberová Eduarda, Dráber Pavel: Function of plant gamma-tubulins. - In: Yaroslav B. Blume, W. Vance Baier, Alla I. Yemets, Diego Breviario (eds.): The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology (NATO monograph), Springer Science and Business Media B. V., pp.23-43, 2008.

5.4 Bakalářské, diplomové a disertační práce

Hošek P: Modelování toku auxinů buňkou. - Bakalářská práce, ČVUT, Fakulta biomedicínského inženýrství, 2008 (spolupráce s ÚEB) *Tato práce byla oceněna Cenou Josefa Hlávky (udělena nadací „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“)*

Kuricová K: Genetická analýza hormonálních regulací u *Brassica napus*. - Bakalářská práce, PřF MU, 2008; Genetika a molekulární biologie.

Didi V: Metody analýzy genové exprese u *Arabidopsis*. - Bakalářská práce, PřF MU, 2008; Genetika a molekulární biologie.

Miklánková E: Imunomodulace jako nástroj funkční proteomiky při studiu hormonálních regulací rostlin. - Bakalářská práce, PřF MU, 2008; Genetika a molekulární biologie.

Bartoš J: Metody analýzy genové exprese u *Arabidopsis*. - Bakalářská práce, PřF MU, 2008; Genetika a molekulární biologie.

Dokládál L: Studium hormonálních regulací u rostlin pomocí kvantifikace interakce mezi proteiny dvoukomponentního signálního systému. - Bakalářská práce, PřF MU, 2008; Biochemie.

Kalousová M: Identifikace isoform fosfolipasy D zapojených v signální dráze kyseliny salicylové u rostlin *Arabidopsis thaliana*. - Bakalářská práce, VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, 2008

Slavíčková N: Úloha fosfolipasy D v procesu přenosu signálů cytokininů. - Bakalářská práce, VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, 2008 (spolupráce s ÚEB)

- Pleskot R.: Studium interakcí rostlinné fosfolipasy D s aktinovým cytoskeletem. - Diplomová práce, VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, 2008 (spolupráce s ÚEB)
- Buchtová D: Exprese genů PsAD1 a PsDRM1 v pupenech hrachu po uvolnění z růstové inhibice. - Diplomová práce, MZLU v Brně, pp. 69, 2008
- Obálová L: Expresia génov transportných proteínov pre auxín v pupeňoch hrachu po uvoľnení z rastovej inhibície. - Diplomová práce, MZLU v Brně, pp. 72, 2008
- Tesaříková Z: Imunocytolokalizace PIN1 v pupenech hrachu po uvolnění z růstové inhibice. - Diplomová práce, MZLU v Brně, pp. 59, 2008
- Mazura P: Molekulární determinace substrátové specifity u rostlinných beta-glukozidáz. - Disertační práce, PřF MU, 2008; Molekulární a buněčná biologie.
- Souček P: Hormonální regulace exprese *KNOX* genů u rostlin. - Disertační práce, PřF MU, 2008; Obecná a molekulární genetika.

5.5 Přednášky

Zvané:

- Kamínek, M.: Role of cytokinins in responses of cereals to limited availability of nitrogen. - Int. Conference "Responses of Plants to Environmental Stresses", May 12 - 18, 2008, Elena, Bulgaria.
- Motyka V.: *Cis*-zeatins in plants: Their occurrence, biological activities and metabolism. - Seminar: University of Belgrade, Institute of Biological Research „Siniša Stanković“, Belgrade, Serbia, 23 April 2008.
- Ruelland E., Valentova O., Krinke O., Flemr M., Burketova L., Zachowski A.: Phospholipase D activation is an early response to salicylic acid in Arabidopsis cells. 18th int. conference on plant lipids, Bordeaux, France, 20. - 24.7.2008
- Valentová O.: Fosfolipidová signální dráha u rostlin. - Seminář na katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty JU, 11.12.2008
- Zažímalová E.: Mechanism and dynamics of auxin transport across plasma membrane. - Int. Conference "Responses of Plants to Environmental Stresses", May 12 - 18, 2008, Elena, Bulgaria.
- Zažímalová E.: Polární transport rostlinného hormonu auxinu na buněčné úrovni: Jak dovnitř a jak ven? - XXI. Biochemický sjezd, České Budějovice, 14.-17.září 2008
- Zažímalová E.: Cellular machinery for polar auxin transport. - University of Bern, Switzerland, November 28, 2008
- Žárský V.: Exocyst complex in plant polarity and morphogenesis. - Botaniker Treffen, Univ. Jena, únor 2008
- Žárský V.: Exocyst complex functions in plant development. - Leeds University, U.K., leden 2008
- Žárský V.: Exocyst complex as integrator of cell polarity. - University of Warwick U.K., leden 2008
- Žárský V.: Genetická analýza řízení buněčné polarity u rostlin. - Biol. fakulta JU, České Budějovice, jaro 2008

Další:

- Gajdošová S, Žižková E, Dobrev PI, Gaudinová A, Hoyerová K, Motyka V: *Cis*-zeatin type cytokinins are biologically active and their metabolism differ from *trans*-zeatin. - International Conference of PhD Students on Experimental Botany „Fresh Insights in Plant Affairs”. P.13. Nové Hradky, Czech Republic, 8-10 April 2008.
- Hála M, Cole R., Synek L, Drdová E, Kulich, I., Pečenková T, Hochholdinger F., Cvrčková F., Fowler J.E., Žárský V : Exocyst complex functions in plant development. - Annual Meeting of the Soc. for Exp. Biol. (SEB), Marseille, France 6.-10.7. 2008
- Hála M, Cole R., Synek L, Drdová E, Pečenková T, Hochholdinger F., Fowler J.E., Žárský V: Plant cell polarity and expansion is regulated by an exocyst complex. - XVI Congress FESPB, Tampere 17-22 August, Finland, 2008
- Hála M, Soukupová H, Žárský V: Prenylation of Rab GTPases. ENPER - 2008 Meeting (Europ. Netw. of Plant Endomemb. Res.) 21. to 25. September. Lecce, Itálie, 2008
- Martan T., Kasik I., Podrazky O., Mrazek J., Pospisilova M., Aubrecht J., Matejec V., Kanka J.: „Local Detection of pH Using Optical Fibre Probes”, Proc. 6th Journees Maghreb-Europe, Les Matériaux et Leurs Applications aux Dispositifs Capteurs (MADICA), Enset-Rabat, 30.10.2008- 1.11.2008 (oral)
- Synek L, Fendrych M, Drdová E, Cole R, Fowler J, Žárský V: The exocyst complex localization and its involvement in plant cell growth. - Gordon Conference “Plant & Fungal Cytoskeleton”, August 3-8, Lucca, Italy, 2008.
- Zažímalová E, Hošek P, Simon S, Hoyerová K, Petrášek J, Jiřina M: Modelling the transport of various auxins on a single cell level. - Int. Conference “Auxin 2008”, October 4-9, 2008, Marrakech, Morocco.

5.6 Fulltext (SPIE-sborník registrovaný Scopus)

T. Martan, J. Kaňka, I. Kašík, V. Matějček: „Tapered optical fibres for sensing”, Proc. SPIE **7138**, Photonics Prague 2008, Prague, August 2008, 71380Z-1 - 71380Z-6.

5.7 Abstrakty

celkem cca 30

navštívená symposia a konference:

- EUROPTRODE IX, Dublin, 30.3.2008-2.4.2008
- International Conference of PhD Students on Experimental Botany „Fresh Insights in Plant Affairs”. P.13. Nové Hradky, Czech Republic, 8-10 April 2008
- Int. Conference “Responses of Plants to Environmental Stresses”, May 12 - 18, 2008, Elena, Bulgaria
- XVI. Cytoskeletální klub, 14. - 16.5., Vranovská Ves 2008
- 33rd FEBS Congress, Atheny, Řecko, 28.6. - 3.7.2008
- Annual Meeting of the Soc. for Exp. Biol. (SEB), Marseille, France 6.-10.7. 2008
- 18th Int. Conference on Plant Lipids, Bordeaux, Francie, 20. - 24.7.2008
- Plant Biology 2008 (The 2008 Joint Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists and the Sociedad Mexicana de Bioquímica Rama: Bioquímica y Biología Molecular de Plantas), Mérida, Mexico 2008
- Gordon Conference “Plant & Fungal Cytoskeleton”, August 3-8, Lucca, Italy, 2008

- FESPB 2008, Tampere, Finland 17.-22.8. 2008
- Photonics Prague 2008, Prague, 27.08.2008 – 29.08.2008
- ENPER – 2008 Meeting (Europ. Netw. of Plant Endomemb. Res.) 21. to 25. September. Lecce, Itálie, 2008
- AUXIN 2008, 4-9 October, Marrakech, Maroko, 2008
- ESF-EMBO symposium Protein Design and Evolution for Biocatalysis, Sant Feliu de Guixols, Spain, 25-30 October 2008

5.7 Práce zaslané do tisku (výčet není úplný):

- Balla, J., Kalousek, P., Reinöhl, V., Friml, J., Procházka, S. (2009) Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls apical dominance in pea. - *Nature Cell Biology*, submitted (MZLU+MU)
- Krinke O., Flemer M., Vergnolle Ch., Collin S., Renou J.-P., Yu A., Burketová L., Valentová O., Zachowski A., Eric Ruelland: Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. - *Plant Physiol*, submitted (VŠCHT+ÚEB+zahr.)
- Mravec J, Bailly A, Zhang J, Hoyerová K, Bielach A, Skůpa P, Petrášek J, Křeček P, Gaykova V, Stierhof Y-D, Luschnig Ch, Benková E, Zažímalová E, Geisler M, Friml: ER-localized PIN5 auxin transporter mediates subcellular homeostasis of phytohormone auxin. - *Nature*, submitted 2009 (zahr+ÚEB)
- Růžička K, Simasková M, Duclercq J, Petrášek J, Zažímalová E, Simon S, Friml J, Van Montagu M, Benková E: Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, submitted 2009 (zahr+ÚEB)

6. Další akce vztahující se k Centru:

Pravidelný seminář Centra „Regulace morfogeneze rostlinných buněk a orgánů“, Křtiny 11. – 12. září 2008 - pořádán MZLU (program viz dále):

Program semináře:

Letní setkání řešitelských týmů centra základního výzkumu

REMOROST

Křtiny, 11. – 12. 9. 2008

11. 9. 2008

10:00 odjezd autobus z Brna

11:00 příjezd do Křtin a ubytování

11:45-12:45 oběd

13:15-13:30 Eva Zažímalová: Úvodní slovo, shrnutí stavu řešení, perspektivy

předsedající: Eva Zažímalová

13:30-13:40 Modelová buněčná linie BY-2 – přínosy a úskalí

Lukáš Fischer

13:40-13:55 bude oznámeno

Ivan Kašík

13:55-14:10 Transport auxinu přes membránu a dynamika vezikulárního transportu

Jan Petrášek

Autoři:

za tým UEB: Jan Petrášek, Siby Simon, Adriana Jelínková, Kateřina Malínská,
Daniela Seifertová, Markéta Pařezová, Eva Zažímalová;

za tým PřF UK: Kateřina Schwarzerová, Gitanjali Nanda, Lenka Havelková,
Erika Belinvia, Jindřiška Fišerová, Zdeněk Pilát

14:10-14:25 Matematické modelování toku auxinů buňkou

Klára Hoyerová

14:25-14:35 PIN5 – aneb co dělají v buňce PINy, když jsou „kratší“?

Petr Skůpa

14:35-14:45 PGP proteiny jako alternativní transportéry auxinu v rostlinných buňkách

Martin Kubeš

14:45-15:00 EXOCYST I

Viktor Žárský

15:00-15:10 EXOCYST II - exocyst a semenné obaly

Ivan Kulich

15:10-15:25 Bioinformatika velkých genových rodin aneb o čem vypovídají (nejen)
hybridní prolinem bohaté proteiny

Fatima Cvrčková, L. Dvořáková, L. Fischer, M. Potocký, D. Oulehlová, V.

Žárský

15:25-15:35 Funkční analýza hybridních prolinem bohatých proteinů buněčné stěny

Lenka Dvořáková

15:35-16:10 přestávka

předsedající Zuzana Novotná

16:10-16:30 Ran GTPases and microtubular cytoskeleton in Arabidopsis

Věra Cenklová, Beata Petrovská, Žaneta Pochylová, Lenka Binarová, Zuzana
Gelová, Pavla Binarová

16:30-16:40 Výzkum role jaderného tubulinu

Erica Bellinvia

16:40-16:50 PLD & co.

Martin Potocký

16:50-17:05 Úloha fosfolipasy D v signální dráze kyseliny salicylové u *Arabidopsis thaliana*

Olga Valentová

17:05-17:20 Interakce fosfolipasy D s aktinovým cytoskeletem

Roman Pleskot

17:20-17:35 Plasmatická membrána jako cíl toxického působení hliníku

Jana Kobrlová

17:35-17:45 Vývoj aerenchymu v kořenech mokřadních rostlin a metodické přístupy k jeho studiu

Miroslav Srba

18:00 - večere, ochutnávka vín ze Školního statku MZLU

12. 9. 2008

předsedající Miroslav Strnad

08:30-09:00 Vývojová specifita působení cytokininů a přenosu cytokininových signálů

Jan Hejátko

09:00-09:20 Dynamika struktury přijímačové domény receptorové histidinkinasy CKII

Blanka Pekárová

09:20-09:45 Cytokininová indukovaná fotomorfogeneze u *Arabidopsis thaliana*

Gabriela Lochmanová, Zbyněk Zdráhal, Hana Konečná, Šárka Koukalová, Jiří

Malbeck, Přemysl Souček, Martina Válková, Nagavalli S. Kiran, Břetislav

Brzobohatý

09:45-09:55 Stabilita exprese housekeeping genů u *A. thaliana* po působení rostlinnými hormony

Přemysl Souček, Břetislav Brzobohatý

09:55-10:15 prezentace sponzora CLF LABORGERÄTE & BIOTECH

10:15-10:30 Molekulární determinace substrátové specifity beta-glukozidáz uvolňujících aktivní cytokininy z jejich O-glukozidů

Pavel Mazura

10:30-11:00 Přestávka

předsedající Radomíra Vaňková

11:00-11:15 Role vakuoly v procesu reverzibilní glukozylace cytokininů, jednoho z prvků homeostáze

Nagavalli S. Kiran

11:15-11:30 Cytokininová cis-zeatinového typu – jejich úloha a metabolismus u vyšších rostlin

Silvia Gajdošová

11:30-11:45 Příspěvek ke studiu výskytu, účinků a metabolismu cytokininů cis-zeatinového

typu u mechu *Physcomitrella patens*

Václav Motyka

11:45-12:00 Nové purinové inhibitory cytokinin oxidázy/dehydrogenázy

Lukáš Spíchal

12:00-12:15 Dynamika exprese genů pro biosyntézu a degradaci cytokininů v listech a kořenech *Arabidopsis* při 25°C a 40°C.

Jana Dobrá

12:15-12:30 Hormonální komunikace mezi dělohami klíčnicích rostlin tykve při lokálně indukované senescenci.

Miroslav Kamínek

12:15-12:30 Role polárního transportu auxinu v uvolňování pupenů z apikální dominance

Jozef Balla

12:30-12:45 Regulace iniciace a růstu laterálních kořenů

Aleš Soukup

12:45 Ukončení setkání

12:50-13:50 Oběd

14:00 odjezd autobusu do Brna