



Fyziologický ústav
Akademie věd
České republiky

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

IČ: 67985823

Sídlo: Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Výroční zpráva o činnosti a hospodaření za rok 2008

Dozorčí radou pracoviště projednána dne: 16. června 2009

Radou pracoviště schválena dne: 23. června 2009

V Praze dne 25. června 2009

I. Informace o složení orgánů veřejné výzkumné instituce a o jejich činnosti či o jejich změnách

a) Výchozí složení orgánů pracoviště

Ředitel pracoviště: RNDr. Jaroslav Kuneš, DrSc.

Zástupce ředitele: prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

Rada pracoviště:

předseda:

RNDr. Jaroslav Kuneš, DrSc.

FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: kunes@biomed.cas.cz

místopředseda:

prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: pacha@biomed.cas.cz

členové:

prof. RNDr. Helena Illnerová, DrSc.

FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: illner@biomed.cas.cz.

prof. RNDr. František Kolář, CSc.

FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: kolar@biomed.cas.cz

RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: sychrova@biomed.cas.cz

RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: vlachova@biomed.cas.cz

Externí členové

prof. MUDr. Jan Herget, DrSc.

2. LF UK, Ústav fyziologie, Plzeňská 221/130

150 00 Praha 5

e-mail: jan.herget@lfmotol.cuni.cz

prof. Ing. Rudolf Poledne, DrSc.
IKEM, Vídeňská 800, 142 20 Praha 4

e-mail: rupo@ikem.cz

prof. MUDr. Helena Tlaskalová-Hogenová, DrSc.
MBÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: tlaskalo@biomed.cas.cz

Tajemnice

Eva Parobečková

FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: parobec@biomed.cas.cz

Dozorčí rada Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i.:

předseda:

prof. MUDr. Josef Syka, DrSc.

ÚEM AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: syka@biomed.cas.cz

místopředsedkyně:

doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc.

FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: kubova@biomed.cas.cz

členové:

RNDr. Petr Dráber, DrSc.

ÚMG AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: draberpe@biomed.cas.cz

prof. MUDr. PhDr. Jana Mačáková, CSc.

LF UP Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

jana.macakova@upol.cz

doc. RNDr. František Sedláček, CSc.

BF JU České Budějovice

Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice
sedlacek@usbe.cas.cz

Tajemník

Ing. Jan Stoklasa
FGÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
stoklasa@biomed.cas.cz

b) Změny ve složení orgánů:

V průběhu roku 2008 nedošlo k žádným změnám.

c) Informace o činnosti orgánů:

Ředitel:

Hlavní aktivity ředitele se soustředily především na zajištění plnění úkolů vyplývajících ze zřizovací listiny a dané výzkumným záměrem. Jeho činnost byla v souladu se Stanovami AV ČR a §17 zákona 341/2005 Sb. Ve spolupráci s Radou pracoviště se zaměřil především na rovnoměrné čerpání rozpočtu, zajištění údržby nemovitostí a personální politiku. V oblasti investiční výstavby byla hlavním úkolem kolaudace dostavby budovy „Da“ a příprava podkladů pro žádost rekonstrukce části bývalé budovy „psince“, která by měla být přebudována na moderní laboratoře.

Rada FGÚ, v.v.i.:

Rada FGÚ AV ČR, v.v.i. (dále jen Rada) se v roce 2008 sešla celkem čtyřikrát. Podrobné zápisy z jednání Rady jsou pravidelně zveřejňovány na Intranetu FGÚ AV ČR, v.v.i. a veřejné nástěnce, čímž je zajištěna informovanost všech zaměstnanců ústavu. Z těchto jednání vyjímáme nejdůležitější body.

Na první schůzi dne 13. února byl schválen rozpočet neinvestičních a investičních prostředků, rozpočet sociálního fondu a byl vysloven dodatečný souhlas na prodloužení výzkumného záměru o jeden rok, tj. do 31. 12. 2011.

Na schůzi 11. června se Rada zabývala výroční zprávou za rok 2007. Výroční zpráva spolu s auditem a účetní rozvahou byla po diskusi jednomyslně schválena. Předseda oznámil, že 10. 6. proběhla kolaudace dostavby budovy Da bez připomínek.

Na svém jednání dne 24. září se Rada zabývala průběžným čerpáním rozpočtu, úpravou jednacího řádu a vyslovila souhlas se zřízením nového oddělení „Kardiovaskulární morfogeneze“. Rada také projednala žádost vedoucí HS na úpravu organizačního řádu zajišťující jednoznačné kompetence vedoucí tohoto oddělení. Členové diskutovali princip jak budou obsazovány uvolněné místnosti po odchodu několika oddělení do nově zkolaudované budovy.

Na prosincové schůzi se členové Rady seznámili s čerpáním rozpočtu, diskutovali střednědobý přehled financování a řadu dalších otázek týkajících se života ústavu. Rada schválila návrh na navýšení mzdové tabulky na rok 2009 o 6%.

Dozorčí rada:

Dozorčí rada (dále jen DR) Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. (dále jen FGÚ) měla v roce 2008 jedno zasedání. Mimo toto zasedání projednala DR některé dokumenty „per rollam“ – a to v souladu s článkem č. 4 Jednacího řádu DR.

1) Zasedání DR dne 6. 6. 2008

Zasedání se zúčastnili všichni členové DR. Zápis z tohoto jednání je přílohou této zprávy.

2) Projednání návrhu „per rollam“ DR dne 11. 12. 2008

a. projednání se zúčastnili tito členové DR - Prof. MUDr. Josef Syka, DrSc., Doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc., Prof. MUDr. PhDr. Jana Mačáková, CSc., Doc. RNDr. František Sedláček, CSc., RNDr. Petr Dráber, DrSc.

b. hlavním bodem projednaným DR :

DR per rollam schvaluje převod investičních prostředků z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. na Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.. Tento převod je nutné uskutečnit v důsledku dokončení dostavby budovy Da. Tím se za účelem uvedení účetního stavu do souladu se skutečností převádí z účetní evidence MBÚ položka 0422- nedokončené stavby ve výši 19 631 915,10 Kč do rozpočtu FGÚ.

II. Informace o změnách zřizovací listiny:

V průběhu roku 2008 nedošlo k žádným změnám ve zřizovací listině.

III. Hodnocení hlavní činnosti:

Cílem výzkumu, který je hlavní činností FGÚ AV ČR, v. v. i. je získávat nové poznatky o fyziologických a patofyziologických procesech na úrovni molekulární, buněčné, orgánové i celého organismu směřující k prohloubení znalostí teoretických základů humánní medicíny. Z hlediska společenské důležitosti celé problematiky je nejdůležitější objasňování patogeneze závažných metabolických, kardiovaskulárních a nervových onemocnění člověka s cílem zlepšit jejich diagnostiku a hledat nové cesty účinné terapie a prevence. V těchto klíčových otázkách bylo ve sledovaném údobí dosaženo řady významných výsledků (viz níže). Hlavními výstupy byly publikace v mezinárodních časopisech s IF. **V roce 2008 bylo publikováno 130 článků s průměrným IF 3.28.**

Dosažené hlavní výsledky

V průběhu roku 2008 bylo dosaženo řady významných výsledků ve všech oblastech zájmu jednotlivých výzkumných skupin. Pro potřeby této výroční zprávy vyjímáme:

1. Energetické potřeby lidského organismu závisí zcela na funkci mitochondriální ATP syntázy, která produkuje až 95% buněčného ATP. Ve spolupráci s Ústavem dědičných poruch metabolismu a Klinikou dětského a dorostového lékařství 1. lékařské fakulty University Karlovy byla objasněna molekulární podstata nové mitochondriální choroby, která postihuje nervosvalový aparát novorozenců a dětí a je vyvolána dysfunkcí ATPázy. U řady pacientů s poruchou mitochondriální energetiky byla nalezena ATP syntáza s normální, nezměněnou strukturou, ale její obsah byl snížen na méně než 30%, protože buňky pacientů tvořily málo enzymu. ATP syntáza je složena z 16ti různých podjednotek a vzniká za pomoci specifických faktorů. Těch byla popsána řada u kvasinek, ale jen tři jsou známy u savců. Pomocí metod molekulární genetiky (celogenomové mapování, exprese genů, analýzy DNA sekvencí) byla ve fibroblastech pacientů nalezena mutace v genu TMEM70, která brání tvorbě mitochondriálního proteinu se zatím neznámou funkcí. Genetická podstata choroby byla potvrzena vnesením zdravého genu TMEM70 do postižených buněk, které obnovilo tvorbu plně funkční ATP syntázy. Mutace TMEM70 genu byla následně prokázána u více než 30ti pacientů z ČR, Slovenska, Rakouska, Německa a dalších zemí. Výsledky studií provedených v rámci Centra aplikované genomiky (1M6837805002) ukázaly, že TMEM70 je novým faktorem biogeneze savčí ATP syntázy a jeho mutace jsou častou příčinou dědičné poruchy ATP syntázy u člověka.

Určení onemocnění podmiňujících genů má zásadní význam pro diagnostiku, prevenci a budoucí terapeutické přístupy u postižených rodin. (Čížková, A. - Stranecký, V. - Mayr, J.A. - Tesařová, M. - Havlíčková, V. - Paul, J. - Ivánek, R. - Kuss, A.W. - Hansíková, H. - Kaplanová, V. - Vrbacký, M. - Hartmannová, H. - Nosková, L. - Honzík, T. - Drahot, Z. - Magner, M. - Hejzlarová, K. - Sperl, W. - Zeman, J. - Houštěk, J. - Kmoch, S.: *TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. Nat Genet. 40, (2008), 1288-1290. (IF = 25.556)*).

2. Pro identifikaci renálně exprimovaných genů, podmiňujících riziko vývinu hypertenze, jsme použili kombinace analýz expresních lokusů kvantitativních znaků (eQTL) v ledvině s celogenomovými korelačními analýzami profilů renální exprese genů s krevním tlakem u rekombinantních inbredních kmenů, odvozených od spontánně hypertenzních potkanů kmene SHR a normotenzních Brown Norway (BN) potkanů. Tato strategie, společně s transplantacemi ledvin u SHR, SHR kongenních a transgenních potkanů, umožnila odhalit deficitní renální expresi Cd36 genu, kódujícího translokázu mastných kyselin, jako geneticky podmíněný rizikový faktor pro spontánní hypertenzi. Je známo, že Cd36 je lokalizovaný v kaveolách endoteliálních buněk spolu s endoteliální syntázou oxidu dusnatého (eNOS) a že eNOS je aktivovaná prostřednictvím myristilace. Vzhledem k tomu, že se snížená aktivita oxidu dusnatého v renální medule považuje za jednu z možných příčin esenciální hypertenze, rozhodli jsme se testovat hypotézu, že mutantní Cd36 ovlivňuje krevní tlak pomocí změn v koncentracích oxidu dusnatého v ledvině. V souhlase s touto hypotézou jsme zjistili významně nižší hladiny cyklického GMP v ledvině a v moči u kmene SHR ve srovnání s SHR Cd36 kongenním a transgenním kmenem, které mají normální Cd36 gen. Jedná se o první lokus kvantitativních znaků asociovaných s krevním tlakem, který byl u nejrozšířenějšího modelu esenciální hypertenze, kmene SHR, odhalen na molekulární úrovni. (Pravenec, M. - Churchill, P.C. - Churchill, M.C. - Viklický, O. - Kazdová, L. - Aitman, T.J. - Petretto, E. - Hubner, N. - Wallace, C.A. - Zimdahl, H. - Zidek, V. - Landa, V. - Dunbar, J. - Bidani, A. - Griffin, K. - Qi, N. - Maxová, M. - Křen, V. - Mlejnek, P. - Wang, J. - Kurtz, T.W.: *Identification of renal Cd36 as a determinant of blood pressure and risk for hypertension. Nat Genet. 40, (2008), 952-954. (IF = 25.556)*).
3. Princip efektivního kódování (vývojové přizpůsobení sensorických neuronů na přirozené prostředí daného organismu) byl dříve studován pouze v případě zraku a sluchu. Autoři zkoumali čichové neurony motýla, pro kterého je tento smysl tím nejdůležitějším. Pro tyto neurony je znám matematický model popisující příjem feromonálního signálu. Na základě modelu byly použitím metody maximalizace vzájemné informace mezi intenzitou stimulace a odpovědí čichového neuronu stanoveny takové charakteristiky

feromonálního signálu, které čichový neuron zpracovává neefektivněji. Získané charakteristiky byly porovnány s charakteristikami skutečných feromonálních signálů, jaké motýl vnímá při lokalizaci samičky. Shoda teoretických i experimentálních charakteristik jasně ukazuje, že čichové neurony jsou evolučními procesy velmi dobře adaptovány na charakter svého přirozeného prostředí. Výzkum vztahů mezi vlastnostmi sensorických systémů a jejich přirozeným prostředím povede k lepšímu pochopení principů evoluce v přírodě, struktury a funkce biologických sensorických systémů, ale také ke zlepšení výkonnosti umělých sensorů obecně. (Košťál, L., - Lánský, P. - Rospars, J.P.: *Efficient olfactory coding in the pheromone receptor neuron of a moth. PLoS Comput Biol.* 4, (2008), e1000053. (IF = 6.236), Rospars, J.P. - Lánský, P. - Chaput, M. - Duchamp-Viret, P.: *Competitive and noncompetitive odorant interactions in the early neural coding of odorant mixtures. J Neurosci.* 28, (2008), 2659-2666. (IF = 7.490)).

4. Savčí chromozomy zabírají oblasti buněčného jádra nazývané chromosomální teritoria (CT), jejichž prostorové uspořádání v buněčném jádře je obecně považováno za nenáhodné. Kontroverzní názory však panují na to, zda jsou jaderné pozice CT/chromatinu zachovány u dceřinných buněk. S cílem přispět k objasnění této sporné otázky jsme analyzovali zachovávání nejen různých jaderných chromatinových oblastí neznámého složení, vybíraných stejným způsobem jako v již publikovaných sporných studiích, ale i chromatinových oblastí asociovaných s jadérkem, jejichž podstatná část je tvořena chromozomy nesoucími NOR (nucleolus organizer region). Pro označení sledovaných chromatinových oblastí jsme použili fotokonvertovatelný rekombinantní histon H4-Dendra2 v transfekovaných lidských HepG2 buňkách, a sledovali označené oblasti až do další interfáze. Třebaže distribuce značeného chromatinu v dceřinných buňkách vykazovala nenáhodný charakter, u převážné většiny buněk se významně lišila od původní, a rovněž původně značený chromatin asociovaný s jadérky byl nacházen odlišným způsobem ve spojení s různými jadérky. Naše výsledky tedy nebyly v souladu s koncepcí zachování polohy CT/chromatinu. Tento závěr byl podpořen zjištěním, že počty jadérek ve dvou dceřinných buňkách se významně lišily. Naše výsledky ukazují, že třebaže jsou v dceřinných buňkách zachovány určité rysy jaderné prostorové organizace CT/chromatinu v transfekované mateřské HepG2 buňky, pro ustavení polohy CT/chromatinu v buňkách dceřinných se uplatní významný stochastický prvek, který způsobí významnou změnu v uspořádání CT/chromatinu. (Cvačková, Z. - Mašata, M. - Staněk, D. - Fidlerová, H. - Raška, I.: *Chromatin position in human HepG2 cells: Although being non-random, significantly changed in daughter cells. J. Struct. Biol.* v tisku, (2008), (IF = 3.677)).

5. Enzym tyrozinhydroxyláza (TH, EC 1.14.16.2) katalyzuje první reakci biosyntézy katecholaminových neuropřenašečů. Aktivita TH je regulována prostřednictvím posttranslačních modifikací její regulační domény. Tato doména obsahuje čtyři fosforylační místa (Ser8, Ser19, Ser31 a Ser40), které jsou fosforylovány řadou různých proteinkináz. Samotná fosforylace Ser19 nemá vliv na aktivitu TH, ale způsobuje její navázání na regulační protein 14-3-3. Tato interakce následně vede ke zvýšení aktivity TH prostřednictvím zatím nepříliš známého mechanismu. Hlavním cílem našeho výzkumu bylo zjistit, jestli vazba proteinu 14-3-3 ovlivňuje strukturu regulační domény TH. Pomocí bodové mutagenese jsme připravili sérii pěti mutantů regulační domény TH, které obsahovaly tryptofanový zbytek na pěti různých pozicích v rámci domény. Časově-rozlišená měření tryptofanové fluorescence ukázaly, že samotná fosforylace Ser19 a Ser40 nemá žádný vliv na strukturu regulační domény. Po navázání proteinu 14-3-3 však došlo k výrazné konformační změně N-koncové poloviny regulační domény TH. Dále jsme zjistili, že vazba proteinu 14-3-3 zvyšuje odolnost regulační domény TH vůči proteolytické degradaci. Analýza spekter cirkulárního dichroismu ukázala, že regulační doména TH je neuspořádaný protein s nízkým obsahem sekundární struktury. Jak fosforylace, tak ani vazba proteinu 14-3-3 nemá vliv na sekundární strukturu regulační domény. Naše výsledky naznačují, že hlavní funkcí 14-3-3 proteinu je stabilizace struktury regulační domény TH a její ochrana před případnou defosforylací a proteolytickou degradací. (Obšilová, V. - Nedbalková, E. - Šilhan, J. - Boura, E. - Herman, P. - Večer, J. - Šulc, M. - Teisinger, J. - Dyda, F. - Obšil, T.: *The 14-3-3 protein affects the conformation of the regulatory domain of human tyrosine hydroxylase. Biochemistry* 47, (2008), 1768-1777. (IF = 3.368)).
6. Detergenty jsou uměle připravené látky, které znečišťují vnější i vnitřní prostředí savčího organismu. Jejich výroba ve světě se stále zvyšuje a mytí nádobí v běžných domácnostech i veřejných stravovacích prostorech je nedostatečné. Ingerce detergentů do organismu střevní sliznicí je proto potencionálním zdrojem chorob. Při práci v in vitro podmínkách, avšak s přirozenou tkání (šedá kůra mozková) se ukázalo, že existuje přesně definovaný *kritický* obor koncentrací neiontových detergentů, ve kterém dochází k aktivaci trimerních G-proteinů. Aktivace se týká specificky hormonem stimulované komponenty. Při vysokých koncentracích dochází k degradaci hormonem-stimulované i basální aktivity G-proteinů. Vliv detergentů na G-proteiny je proto bifazický. Efekt detergentů se projevuje ve vnitřní, hydrofobní zóně membrány. Dochází ke změnám strukturních i dynamických parametrů hydrofobních

fluoreskujících membránových sond diphenylhexatrienu (DPH) a laurdanu ve smyslu zvýšení mobility sondy a snížení její strukturní uspořádanosti. Přímý vliv detergentů na vazebné místo receptoru je pouze inhibiční. Tento výsledek podporuje naše dřívější nálezy, že uspořádání vnitřní, hydrofobní zóny buněčné membrány mění účinnost funkčního spřažení mezi receptory a G-proteiny (*intrinsic activity*). Z praktického hlediska je třeba zvažovat průnik detergentů to membránových struktur savčího organismu a nezanedbávat možnost jejich vlivu na účinnost signálních kaskád iniciovaných nervovými přenašeči. (Durchánková, D. - Novotný, J. - Svoboda, P.: *The time-course of agonist-induced solubilization of trimeric G(q)alpha/G(11)alpha proteins resolved by two-dimensional electrophoresis. Physiol Res. 57, (2008), 195-203. (IF = 1.505)*, Drastichová, Z. - Bouřová, L. - Lisý, V. - Hejnová, L. - Rudajev, V. - Stohr, J. - Durchánková, D. - Ostašov, P. - Teisinger, J. - Soukup, T. - Novotný, J. - Svoboda, P.: *Subcellular redistribution of trimeric gproteins - potential mechanism of desensitisation of hormone response; internalisation, solubilization, down-regulation. Physiol Res. 57, Suppl. 3, (2008), S1-S10. (IF = 1.505)*, Ostašov, P. - Krůšek, J. - Durchánková, D. - Svoboda, P. - Novotný, J.: *Ca²⁺ responses to thyrotropin-releasing hormone and angiotensin II: the role of plasma membrane integrity and effect of G11alpha protein overexpression on homologous and heterologous desensitization. Cell Biochem Funct. 26, (2008), 264-274. (IF = 1.561)*).

Výsledky dosažené v rámci výzkumných Center

Centrum výzkumu chorob srdce a cév (1M0510)

Při studiu mechanismů, jimiž může noradrenalin aktivovat otevření napěťově řízených vápníkových kanálů L typu (L-VDCC), jsme prokázali, že vyřazení inhibičních G (Gi) proteinů pomocí i.v. podání pertusis toxinu (PTX) nejen výrazně snižuje presorické působení exogenních i endogenních katecholaminů, ale také omezuje pokles krevního tlaku po akutní bloádě L-VDCC pomocí nifedipinu. Vyřazení Gi proteinů blokuje více alpha₂- než alpha₁-adrenergní mechanismy. V pokusech *in vivo* jsme prokázali, že alpha₂-adrenergní blokáda yohimbinem působí větší posun dávkově závislého presorického působení noradrenalinu doprava u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) než u jejich normotenzních kontrol (WKY). Díky přetrvávajícímu zvýšení alpha₂-adrenergní aktivity zůstává u SHR potkanů vystavených akutní alpha₁-adrenergní bloádě (prazosin) zvýšena maximální presorická odpověď na noradrenalin ve srovnání s WKY potkany. Vyšší alpha₂-adrenergní aktivita u hypertenzních zvířat vysvětluje, proč byl efekt PTX mnohem větší u SHR než u WKY. Protože zvýšená alpha₂-adrenergní aktivita vede ke snížení hladin cAMP, což zvyšuje influx vápníku cestou L-VDCC, naše současné úsilí se zaměřuje na objasnění otázky, do jaké míry může β-adrenergní

signalizace korigovat tuto poruchu u SHR. (Čáčanyiová, S. - Kristek, F. - Kuneš, J. - Zicha, J.: *The effects of pertussis toxin-treatment on integrated vasoactive response of vascular system in spontaneously hypertensive rats. Physiol Res.* 57, (2008), 137-139. (IF = 1.505), Lísková, S. - Kuneš, J. - Zicha, J.: *Nifedipine-sensitive vascular reactivity of femoral arteries in WKY: the effects of pertussis toxin pretreatment and endothelium removal. Physiol Res.* 56, (2007), 663-666. (IF = 1.505), Zemančíková, A. - Torok, J. - Zicha, J. - Kuneš, J.: *Inactivation of G(i)proteins by pertussis toxin diminishes the effectiveness of adrenergic stimuli in conduit arteries from spontaneously hypertensive rats. Physiol Res.* 57, (2008), 299-302. (IF = 1.505)).

Centrum Aplikované Genomiky (1M6837805002)

Biosyntéza mitochondriální ATP syntázy zahrnuje expresi 16ti jaderných a 2 mitochondriálních genů kódujících podjednotky enzymu Regulace biogeneze za různých fyziologických stavů je podmíněna koordinovanou tvorbou všech podjednotek enzymu. Na souhře jaderného a mitochondriálního genomu se podílí jak regulace transkripce jednotlivých genů, tak posttranskripční mechanismy. Koordinovaná kontrola translace mRNA ATP syntázového komplexu může být výsledkem formování mRNA-proteinových komplexů. Posttranskripční regulace mRNA řady genů závisí na specifických sekvenčních motivech (cis-acting factory) ve 3' a 5' netranslatovaných oblastech, nebo v kódujících sekvencích na které se vážou specifické vazebné proteiny (trans-acting factory). Naše studie ve spolupráci s Wenner-Gren Institutem University ve Stockholmu ukázaly, že mRNA pro beta-F₁, klíčovou katalytickou podjednotku savčí mitochondriální ATP syntázy tvoří dva typy mRNA proteinových komplexů (RPC1 a RPC2). Jejich formování závisí na polyA a netranslatované 3' oblasti. Detailní analýza reaktivity jednotlivých úseků 3' sekvence beta-F₁ ukázala, že tyto regulační proteiny se vážou jiným mechanismem, protože vytváření RNA-proteinového komplexu mRNA nezávisí na konvenčním motivu v sekvenci 3' nepřekládané oblasti, ale na přítomnosti predikovaných sekundárních (stem-loop) struktur na 3' konci. (Kramářová, T.V. - Antonická, H. - Houštěk, J. - Cannon, B. - Nedergaard, J.: *A sequence predicted to form a stem-loop is proposed to be required for formation of an RNA-protein complex involving the 3'UTR of beta-subunit F0F1-ATPase mRNA. Biochim Biophys Acta.* 1777, (2008), 747-757. (IF = 3.835)).

Centrum neurověd (LC554)

Pracovníci oddělení buněčné neurofyziologie prokázali, že přirozeně se vyskytující neurosteroid - pregnenolon sulfát - pozitivně alosterickým mechanismem moduluje aktivitu NMDA podtypu ionotropních glutamátových receptorů. Farmakologická inhibice protein fosfatázy 2B (calcineurin) naznačila, že defosforylace snižuje míru potenciace vyvolanou neurosteroidem a naopak k maximální potenciaci dochází po

aktivaci cAMP závislé protein kinázy. Výsledky strukturálně-funkčních studií zaměřených na objasnění mechanismů farmakologické desenzitizace vaniloidního receptoru potypu 1 prokázaly, že 6. transmembránová doména s přilehlou oblastí cytoplazmatického konce má zásadní vliv na časový průběh aktivace a akutní desenzitizace vyvolané kapsaicinem. Využitím molekulárně biologických a elektrofyzilogických technik autoři prokázali, že tento mechanismus modulace je pravděpodobně zprostředkován interakcí kladně nabitých aminokyselinových zbytků v proximální oblasti karboxylového konce s membránovými fosfolipidy a vyslovili hypotézu, že podobný mechanismus se vzhledem k homologii některých funkčních domén může uplatňovat také u strukturálně příbuzných proteinů. Cais, O. - Sedláček, M. - Horák, M. - Dittert, I. - Vyklický, L., Jr.: *Temperature dependence of NR1/NR2B NMDA receptor channels. Neuroscience. 151, (2008), 428-438. (IF = 3.352)*, Sedláček, M. - Kořínek, M. - Petrovič, M. - Cais, O. - Adamusová, E. - Chodounská, H. - Vyklický Jr, L.: *Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission. Physiol Res. 57, Suppl. 3, (2008), S49-S57. (IF = 1.505)*, Vyklický, L. - Nováková-Toušová, K. - Benedikt, J. - Samad, A. - Touška, F. - Vlachová, V.: *Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. Physiol. Res. 57, Suppl. 3, (2008), S59-S68. (IF = 1.505)*).

Centrum neuropsychiatrických studií (1M0002375201)

Orientace a řízení pohybu v prostředí je důležitou funkcí nervového systému. V oblasti farmakologie prostorové kognice byla testována role adrenergických receptorů na regulaci chování v animálním modelu úlohy vyhýbání se místu (AAPA). Autoři studovali vliv alfa1- a alfa2-adrenoceptorů za pomoci antagonistů prazosinu a idazoxanu. Látky byly aplikovány v dostatečném odstupu před testováním v úloze AAPA a byla studována rovněž dávková závislost působení těchto blokátorů [1] (Stuchlík a Valeš, 2008). Výsledky studia interakce alfa1-adrenergických receptorů s dopaminovými D2 receptory prokázaly, že se jedná o synergistické působení obou těchto typů receptorů [2]. Autoři rovněž studovali vliv antipsychotik na animální model schizofrenie navozený aplikací MK-801, antagonisty NMDA podtypu glutamátových receptorů. Aplikace ritanserinu a risperidonu, které působí mj. na 5-HT2 receptory, zmírnila kognitivní deficit po podání MK-801 [3]. Tyto výsledky naznačují důležitost serotonergního systému pro ovlivnění kognitivního deficitu v animálním modelu. Vzhledem ke skutečnosti, že prostorové chování zvířat je projevem vyšších nervových funkcí a je také využíváno jako model lidské deklarativní paměti, mohou uvedené výsledky přispět k rozlišení příčin a důsledků některých kognitivních poruch a demencí. ([1] Stuchlík, A. - Valeš, K.: *Role of alpha1- and alpha2-adrenoceptors in the regulation of locomotion and spatial behavior in the active*

place avoidance task: a dose-response study. *Neurosci Lett.* 433, (2008), 235-240. (IF = 2.085), [2] Stuchlík, A. - Petrášek, T. - Valeš, K.: Dopamine D2 receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. *Behav Brain Res.* 189, (2008), 139-144. (IF = 2.626), [3] Bubeniková-Valešová, V. - Stuchlík, A. - Svoboda, J. - Bureš, J. - Valeš, K.: Risperidone and ritanserin but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, (2008), 1061-1066. (IF = 9.598)).

Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek

Byl dokončen soubor prací zabývajících se vývojem nástrojů genového inženýrství pro kvasinku *Zygosaccharomyces rouxii* a využitím těchto nástrojů pro studium jejích specifických vlastností, zejména vysoké osmotolerance. Připravili jsme auxotrofní mutantní kmeny obsahující různé kombinace mutací *ura3*, *leu2* nebo *ade2*. Izolovali jsme a funkčně charakterizovali centromery *Z. rouxii*, připravili první centromerové vektory s různými selekčními geny. Analyzovali jsme přirozený plasmid *Z. rouxii* pSR1, a využili jsme část jeho sekvence pro konstrukci různých episomálních plasmidů. Vytvořili jsme systém pro vícenásobnou delecí genů prostřednictvím kazety *loxP-kanMX-loxP* a plasmidu exprimujícího rekombinasi *cre*. Ověřili jsme využití GFP pro lokalizaci proteinů v *Z. rouxii*, a pro tento účel připravili plasmid pZGFP. Vznikl tak soubor nástrojů umožňující v *Z. rouxii* řízenou expresi genů, přípravu vícenásobných delečních mutantů a určení lokalizace proteinů v buňkách. K osmotoleranci kvasinek přispívají transportní systémy pro kationy alkalických kovů, včetně Na^+/H^+ antiporterů. V genomu *Z. rouxii* jsme identifikovali a klonovali dva geny kódující možné Na^+/H^+ antiportery. Produkty obou genů jsme charakterizovali a) heterologní expresí v *S. cerevisiae* a b) konstrukcí kmenů *Z. rouxii* postrádajících či naopak zvýšeně exprimujících jeden nebo oba přenašeče. Přenašeč *ZrNha1* má schopnost eliminovat z buněk hlavně draselné kationy, a je tak důležitý zejména pro toleranci vysoké vnější koncentrace draselných iontů a udržování homeostáze K^+ , zatímco přenašeč *ZrSod2-22* je důležitý pro detoxifikaci Na^+ či Li^+ . Analýzou „synteny“ genů (tj. pořadí genů na chromosomu) jsme zjistili, že gen *ZrSOD2-22* vznikl patrně duplikací předka genu *ZrNHA1* a inzercí kopie do jiného místa genomu. (Příbylová, L. - de Montigny, J. - Sychrová, H.: Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast.* 24, (2007), 171-180. (IF = 2.619), Příbylová, L. - Straub, M.L. - Sychrová, H. - de Montigny, J.: Characterisation of *Zygosaccharomyces rouxii* centromeres and construction of first *Z. rouxii* centromeric vectors. *Chromosome Res.* 15, (2007), 439-445. (IF = 3.469), Příbylová, L. - Farkaš, V. - Slaninová, I. - de Montigny, J. - Sychrová, H.: Differences in osmotolerant and cell-wall properties of two *Zygosaccharomyces*

rouxii strains. *Folia Microbiol (Praha)*. 52, (2007), 241-245. (IF = 0.989), Příbylová, L. - de Montigny, J. - Sychrová, H.: Tools for the genetic manipulation of *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Res.* 7, (2007), 1285-1294. (IF = 2.812), Příbylová, L. - Papoušková, K. – Sychrová, H.: The salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two plasma-membrane Na⁺/H⁺-antiporters (*ZrNha1p* and *ZrSod2-22p*) playing different roles in cation homeostasis and cell physiology. *Fungal Genet Biol.* 45, (2008), 1439-1447. (IF = 3.425)).

Výzkumné centrum základního výzkumu „Fluorescenční mikroskopie biologickém a lékařském výzkumu“

V rámci centra základního výzkumu „Fluorescenční mikroskopie v biologickém a lékařském výzkumu“ (MŠMT LC06063) jsme pokračovali ve vývoji metod pro optimální snímání biologických trojrozměrných obrazových dat konfokální a dvoufotonovou mikroskopií. Vyvinuli jsme novou metodiku pro objemové rekonstrukce velkých biologických vzorků, při které byla nejprve získána série fyzických histologických řezů a následně byly z jednotlivých fyzických řezů nasnímány série optických řezů (1). Pro účely počítačové trojrozměrné rekonstrukce celého vzorku byly složeny série optických řezů ze sousedních zorných polí v rámci každého fyzického řezu i slícovány optické řezy v následných fyzických řezech. K tomuto slícování jsme využili speciálních postupů, využívajících elastickou registraci obrazů, která kompenzovala deformace, které v jednotlivých fyzických řezech vznikly při řezání vzorku mikrotomem. Zde jsme použili apriorní informaci z obrazů řezných ploch vzorku, získaných USB kamerou těsně před odříznutí řezu mikrotomem. Dále jsme podrobně studovali možnosti kombinace různých zobrazovacích technik konfokální mikroskopie při snímání tkání *in vivo*, konkrétně detekce odraženého signálu při použití jednofotonové excitace a snímání autofluorescence a druhé harmonické generované dvoufotonovou excitací (2). Tyto možnosti pokročilých mikroskopických technik byly ukázány na příkladu studia tkáně experimentálního myšího melanomu před a po aplikaci hypertermie pomocí mikrovlňného záření. Ukázalo se, že mohou přinést řadu užitečných informací o vnitřní struktuře melanomu i tkání zdravé kůže, přičemž proměřením nasnímaných obrazových dat je možné získat kvantitativní parametry, citlivě odrážející změny tkáně melanomu v důsledku hypertermického působení, jako je např. maximální Euler-Poincarého charakteristika. ((1) Čapek, M. - Brůža, P. - Janáček, J. - Karen, P. - Kubínová, L. - Vágnerova, R.: Volume reconstruction of large tissue specimens from serial physical sections using confocal microscopy and correction of cutting deformations by elastic registration. *Microsc Res Tech.* (2008), DOI 10.1002/jemt.20652 Published Online: Nov 10 2008. (IF = 1.644), (2) Chernyavskiy, O. – Vannucci, L. - Bianchini, P. - Difato, F. - Saieh, M. - Kubínová, L.: Imaging of mouse experimental melanoma *in vivo* and *ex vivo* by

combination of confocal and nonlinear microscopy. Microsc Res Tech. (v tisku). (IF = 1.644)).

Spolupráce s vysokými školami na uskutečňování bakalářských, magisterských a doktorských studijních programů a vzdělávání středoškoláků

Pracovníci ústavu se v uplynulém roce opět velmi výrazně podíleli na pregraduální výuce studentů řady fakult, především UK Praha. V rámci této aktivity byly na ústavu realizovány celkem 3 diplomové práce. Vedle toho pracovalo v ústavu 31 studentských vědeckých sil (SVS). Velmi hojná je účast pracovníků ústavu v postgraduálním vzdělávání nejen formou přednášek, odborných kurzů, ale především vedením experimentálních prací, které vedou absolventy k získání titulu PhD. V roce 2007 bylo na ústavu 75 postgraduálních studentů (z toho 10 cizinců) a v průběhu roku obhájilo 11 studentů (z toho 2 cizinci). Jedna vedoucí vědecká pracovnice ústavu obhájila titul DSc (DrSc).

Pracovníci oddělení Bioenergetiky ve spolupráci s 1. LF UK v Praze získali významné ocenění v projektu „Česká hlava“. PhD studentka Alena Čížková, pracující na problematice vzácných mitochondriálních onemocnění u dětí, byla oceněna v kategorii „Doctorandus“.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i. se již tradičně zapojil do Středoškolské odborné činnosti (SOČ). Studenti středních škol mohou provádět experimentální práce v laboratořích ústavu pod odborným vedením vědeckých a odborných pracovníků ústavu. Práce, kterou vypracovala na našem ústavu v rámci této činnosti studentka 3. ročníku T. Havlenová, získala nejvyšší ocenění v oboru biomedicina za vynikající středoškolskou práci. Podobně uspěla studentka 3. ročníku gymnázia M. Korcová, která získala cenu Genus v projektu České hlavičky.

Rovněž jsme zorganizovali pravidelné „Dny otevřených dveří“ především se zaměřením na zájemce z řad středoškolských studentů.

Ústav ve spolupráci se Zemědělskou univerzitou v Praze organizuje pravidelné kurzy pro vysokoškoláky a technický personál týkající se zákona na ochranu zvířat proti týrání a práce s laboratorními zvířaty. V roce 2008 se uskutečnily 2 kurzy pro vysokoškoláky a 2 kurzy pro středoškoláky.

Spolupráce s aplikovaným výzkumem a výrobní sférou

V Oddělení biologie tukové tkáně probíhal od roku 2003 výzkum ve spolupráci s norskou firmou Pronova Biocare AS zaměřený na mechanismus, kterým n-3 polynenasycené mastné kyseliny (n-3 PUFA) z mořských ryb snižují hromadění tělesného tuku a zvyšují citlivost

organizmu na insulin. Tento výzkum byl podkladem čtyř patentových přihlášek ve spolupráci mezi FgÚ a firmou Pronova Biocare AS, které jsou nyní v různých fázích mezinárodního schvalování. Výzkum biologických účinků derivátů kyseliny dokosahexaenové (DHA) vedl k objevu silného vlivu jednoho z derivátů (t.j. α -ethyl DHA ethyl esteru) na citlivost k insulinu. Podařilo se prokázat, že u myši krmených vysokotukovou dietou derivát DHA významně zvyšuje citlivost k insulinu, snižuje hladiny lipidů v plazmě a brání hromadění tuku v těle. Výsledky byly přijaty k publikaci (Rossmeisl a spol., *Obesity*). Tím byla spolupráce s firmou Pronova Biocare AS ukončena. Započala nová spolupráce v oblasti využití n-3 PUFA pro léčbu obezity a insulinové rezistence, s firmou EPAX AS, rovněž v Norsku. Na základě spolupráce mezi FgÚ a firmou EPAX AS byla v roce 2008 podána první patentová přihláška k Norskému patentovému úřadu.

U přihlášky patentové ochrany "Liposomal gel phthalocyanine preparation for photodynamic therapy of tumors and its manufacturing" ("Liposomální gelový ftalocyaninový preparát pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění a způsob jeho přípravy") v r. 2008 byl udělen čs. patent č 298978 a u patentové přihlášky PCT pro celý svět byla doložena původnost návrhu a získáno osvědčení o původnosti vynálezu od úřadu PCT v Ženevě. Technické řešení se týká aplikačního gelu s liposomy pro fotodynamickou terapii nádorových onemocnění, který obsahuje hydrofobní formu ftalocyaninu hydroxyhlinitého FCH (resp. hliník-Al substituován Si, Zn, aj. kovy) modifikovanou pro následné zpracování na mikrofluidizéru. Výsledný gel obsahující liposomy s inkorporovaným FCH je při terapii aplikován na povrchové nádory v dermatologii či na další nádory dostupné světlovody, a po pouhých několika minutách je ozářen světlem příslušné vlnové délky. Navržená soustava umožňuje okamžité pronikání účinné látky do nádoru a téměř okamžité osvětlení (v minutových intervalech od aplikace) s následujícím dezintegračním účinkem na nádor. Tento vysoce účinný dezintegrační výsledek terapie je podmíněn navrženou soustavou. Poloprovodně průmyslově připravený preparát byl podrobně testován při experimentální fotodynamické terapii lidského kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu, melanomu a basaliomu, implantovaných athymickým nu-nu myším, s výsledkem 100% účinnosti ve vyšších dávkách a účinnosti klesající se zvyšující se viabilitou tumorů v dávkách nižších (účinnost klesala v pořadí basaliom > karcinom prsu > melanom > kolorektální karcinom). Tyto výsledky byly dosaženy pro interval TDL mezi aplikací gelu s liposomy a ozářením pouhých 10 min. Dohoda s farmaceutickými výrobci je v jednání.

Ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie AVČR a s Univ. Victor Ségalen, Bordeaux, Francie jsme připravili fibrinové sítě

pro podporu kolonizace biomateriálů buňkami. Některé z nich jsme i prakticky použili k urychlení endotelializace, a tím k inovaci klinicky užívaných polyetylentereftalátových cévních protéz vyráběných v podniku VÚP a.s., Brno. Nově vyvíjené fibrinové sítě měly definovanou tloušťku a tzv. dvou- i trojrozměrnou nanovláknennou strukturu (2D, 3D). Byly připraveny s použitím inhibitorů trombinu volného i adsorbovaného. Na fibrinových sítích byla pak hodnocena adheze, růst a diferenciací zvířecích i lidských cévních endotelových buněk. Ultratenké fibrinové 2D povrchy významně zvýšily rozprostření endotelových buněk v porovnání s 3D sítí. Počet buněk po 7 dnech kultivace byl na 2D i 3D vrstvách významně vyšší než na kontrolním polystyrénovém kultivačním povrchu s výjimkou vzorků připravených pomocí heparinu, které se od kontrolních nelišily. Enzymatická imunisorbentní esej (ELISA) ukázala, že koncentrace von Willebrandova faktoru, markeru diferenciací cévních endotelových buněk, je v buňkách kultivovaných na 3D fibrinových sítích statisticky významně zvýšena. U buněk na všech fibrinových vzorcích byly dobře vytvořené fokální adhezní plaky obsahující proteiny zprostředkující adhezi buněk, jako jsou alfa_v-integriny, vinkulin a talin. Nově vyvíjené 2D fibrinové sítě se zdají vhodné především k pokrývání povrchu uvnitř 3D polymerních matic s póry o průměru několik desítek či stovek mikrometrů, kde neuzavřou póry a urychlí vrůstání buněk dovnitř matrice. 3D fibrinovými sítěmi pak lze upravit vnitřní povrch umělých cévních protéz. Je možno je připravit přímo z krve daného pacienta, čímž se lze vyhnout případné imunitní reakci pacienta na cizorodý materiál. (Filová, E. - Brynda, E. - Riedel, T. - Bačáková, L. - Chlupáč, J. - Lisá, V. - Houška, M. - Dyr, J.E.: *Vascular endothelial cells on two-and three-dimensional fibrin assemblies for biomaterial coatings. J Biomed Mater Res A. (2008), s. DOI 10.1002/jbm.a.32065. (IF = 2.612), Brynda, E. - Riedel, T. - Dyr, J. - Houska, M. - Bačáková, L. - Filová, E. - Chlupáč, J. - Lesný, P. - Jendelová, P. - Syková E.: Způsob přípravy regulovaných vrstev fibrinu na pevných površích (Controlled preparation of fibrin layers on solid surfaces); **Czech patent**, Úřad průmyslového vlastnictví (Industrial Property Office, Czech Patent and Trademark Office), Prague, Czech Rep., registered under No. 299687, submitted in 2006, accepted in 2008).*

Mezinárodní spolupráce

Již tradičně probíhala mezinárodní spolupráce na bázi dvoustranných dohod a nebo v rámci řešení společných projektů. Z dosažených výsledků vybíráme následující příklady.

1. Laboratorní potkan patří mezi nejčastěji používané modelové organizmy. Inbrední kmeny laboratorního potkana byly odvozeny z limitované populace a zděděná genetická variabilita zafixovaná v těchto kmenech představuje vynikající nástroj pro korelační analýzy mezi genotypy a fenotypy. V této zprávě je popsána nově odhalená

genetická variabilita kmenů laboratorního potkana pomocí téměř 3 milionů nově detekovaných SNP. Pomocí více než 20,000 vybraných SNP byly získány přesné a kompletní genotypy 167 různých inbredních kmenů, 2 sad rekombinantních inbredních kmenů a jedné F2 generace. Byla získána podrobná genetická mapa potkana a byl zjištěn stupeň vazbové nerovnováhy u laboratorního potkana. Byla rovněž demonstrována užitečnost nových SNP map pro identifikaci lokusů kvantitativních znaků u rekombinantních inbredních kmenů. Tato data získaná rozsáhlým mezinárodním konsorciem jsou veřejně přístupná pro vědeckou komunitu. Dostupnost informací o přesných polymorfizmech inbredních kmenů laboratorního potkana, prezentovaných v této studii, představuje neobyčejně užitečný genetický nástroj pro genomické analýzy a navíc umožní rozsáhlé komparativní studie s ortologními lokusy u myši a lidí. Předpokládá se, že tento zdroj bude v blízké budoucnosti využit k resekvenaci klíčových inbredních kmenů laboratorního potkana, k odhalení řady nových asociací a konečně k identifikaci lokusů kvantitativních znaků na molekulární úrovni s cílem zjistit úlohu ortologních lokusů v patogenezi běžných onemocnění u lidí. (Saar, K. - Beck, A. - Bihoreau, M.T. - Birney, E. - Brocklebank, D. - Chen, Y. - Cuppen, E. - Demonchy, S. - Dopazo, J. - Flicek, P. - Foglio, M. - Fujiyama, A. - Gut, I.G. - Gauguier, D. - Guigo, R. - Guryev, V. - Heinig, M. - Hummel, O. - Jahn, N. - Klages, S. - Kren, V. - Kube, M. - Kuhl, H. - Kuramoto, T. - Kuroki, Y. - Lechner, D. - Lee, Y.A. - Lopez-Bigas, N. - Lathrop, G.M. - Mashimo, T. - Medina, I. - Mott, R. - Patone, G. - Perrier-Cornet, J.A. - Platzer, M. - Pravenec, M. - Reinhardt, R. - Sakaki, Y. - Schilhabel, M. - Schulz, H. - Serikawa, T. - Shikhagaie, M. - Tatsumoto, S. - Taudien, S. - Toyoda, A. - Voigt, B. - Zelenika, D. - Zimdahl, H. - Hubner, N.: *SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat. Nat Genet.* 40, 5, (2008), 560-566. (IF = 25.556)).

2. Mononenasyčené mastné kyseliny, jako např. kyselina olejová, ovlivňují fyzikálně chemické vlastnosti buněčných membrán, regulují vodivost iontových kanálů, zvyšují elektrickou stabilitu buněk a vykazují kardioprotektivní účinky. V rámci zahraniční spolupráce (University of Balearic Islands, University of Toronto, University of Hong Kong) jsme studovali vliv 2-hydroxyolejové kyseliny (2-OHOA, nehydrolyzovatelný derivát kyseliny olejové) na cyklické změny cytosolické koncentrace vápenatých iontů a kontraktilitu kardiomyocytů izolovaných z různých srdečních oddílů dospělých potkanů. Zjistili jsme, že 2-OHOA významně zvýšila vápníkový signál a rychlost zkrácení pouze u subpopulace myocytů izolovaných z levé a pravé komory, nikoliv však z mezikomorového septa. Podobný profil účinku byl zjištěn po podání 4-aminopyridinu, inhibitoru přechodného draslíkového proudu (I_{to}), přičemž působení obou látek nebylo aditivní. Jak 2-OHOA, tak 4-aminopyridin

vyvolaly translokaci proteinkinázy C- α z cytosolu do membrán, avšak (na rozdíl od vápníkového signálu a kontraktility) tento účinek se projevil ve všech srdečních oddílech. Z výsledků vyplývá, že selektivní zvýšení vápníkového signálu a kontraktility komorových myocytů vyvolané 2-OHOA je důsledkem inhibice I_{to} , nesouvisí však s translokací proteinkinázy C- α . Tato pozitivně inotropní odpověď by mohla přispívat k příznivým kardiovaskulárním účinkům této látky. (Borchert, G.H. - Giggey, M. - Kolar, F. - Wong, T.M. - Backx, P.H. - Escriba, P.V.: 2-hydroxyoleic acid affects cardiomyocyte $[Ca^{2+}]_i$ transient and contractility in a region-dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294, 4, (2008), H1948-1955. (IF = 3.973)).

3. V rámci dlouhodobé spolupráce s Ústavem normální a patologické fyziologie SAV v Bratislavě byl prokázán význam endoteliálního konstričního faktoru (EDCF, produkt cyklooxygenázy) pro udržování zvýšeného krevního tlaku u NO-deficitní formy hypertenze vyvolané chronickou bloádou NO syntázy pomocí L-NAME. Také při regresi hypertenze po vysazení L-NAME přetrvává zvýšená tvorba EDCF, která spolu s perzistencí strukturálních změn arteriálního řečiště podmiňuje zpomalený návrat krevního tlaku k normě (1). U dospělých spontánně hypertenzních potkanů (SHR) s rozvinutou formou genetické hypertenze bylo studováno antihypertenzní působení chronického podávání N-acetylcysteinu (NAC) a melatoninu. Obě látky svým antioxidačním působením zvyšovaly NO-dependentní relaxaci cév, ale větší antihypertenzní účinek melatoninu lze připsat vasorelaxaci nezávislé na NO (2). Účinky NAC u dospělých SHR však byly podstatně menší než u mladých zvířat (3), což je v souladu s představou, že zvýšená produkce kyslíkových radikálů hraje významnější úlohu při vzniku než při udržování hypertenze. Ke stejným závěrům dospěla také naše předchozí studie u NO-deficitní hypertenze (4). (1. Paulis, L. - Zicha, J. - Kuneš, J. - Hojná, S. - Behuliak, M. - Celec, P. - Kojsová, S. - Pecháňová, O. - Šimko, F.: Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertens Res.* 31, (2008), 793-803. (IF = 2.951), 2. Pecháňová, O. - Zicha, J. - Paulis, L. - Zenebe, W. - Dobešová, Z. - Kojsová, S. - Jendeková, L. - Sládková, M. - Dovinová, I. - Šimko, F. - Kuneš, J.: The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension, *Eur J Pharmacol.* 561 (2007), 129-136, (IF = 2.376), 3. Pecháňová, O. - Zicha, J. - Kojsová, S. - Dobešová, Z. - Jendeková, L. - Kuneš, J.: Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension. *Clin Sci (Lond).* 110, (2006), 235-242. (IF = 3.900), 4. Rauchová, H. - Pecháňová, O. - Kuneš, J. - Vokurková, M. - Dobešová, Z. - Zicha, J.: Chronic N-acetylcysteine administration prevents development of hypertension in N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester-treated rats: the role of reactive oxygen species. *Hypertens Res.* 28, (2005), 475-482. (IF = 2.951)).

4. Postupné ochabování mentálních funkcí doprovází přirozené stárnutí a ve zvýrazněné podobě je charakteristickým příznakem Alzheimerovy nemoci. Jedná se o nejčastější neurodegenerativní onemocnění centrálního nervového systému u člověka. Prvotní příčinou vzniku nemoci je zvýšená produkce β -amyloidu, jejíž důvod je známý u familiárních (geneticky podmíněných) případů. U mnohem početnějších sporadických případů je příčina zvýšené tvorby β -amyloidu nejasná. Pravidelným nálezem u potvrzených případů onemocnění jsou změny cholinergních markerů a jedinými prokazatelně účinnými léky jsou inhibitory cholinesteráz, což ukazuje na poškození funkce cholinergních synapsí. Ve spolupráci s Universitou Kuopio, ve Finsku jsme u transgenního myšího modelu Alzheimerovy nemoci APP^{swe}/PS1^{dE9}, který produkuje zvýšené množství β -amyloidu, studovali změny markerů cholinergních synapsí v mozkové kůře u mladých (7 měsíců) a starých (17 měsíců) kontrolních a transgenních myší. Zjistili jsme úbytky těchto markerů, které závisely jednak na věku (přirozené stárnutí), jednak na přítomnosti transgenu (zvýšení produkce β -amyloidu). Aktivita presynaptického markeru cholinacetyltransferázy ubývala pouze s věkem zatímco aktivita váčkového přenašeče pro acetylcholin byla závislá jak na věku, tak na přítomnosti transgenu. Na postsynaptické úrovni jsme našli snížení aktivace signálních drah muskarinových receptorů, které záviselo na věku i přítomnosti transgenu. Poškození presynaptické i postsynaptické části cholinergních synapsí se projevovalo již u mladých transgenních zvířat v době, kdy ještě nedochází k výrazné nadprodukci β -amyloidu a tvorbě amyloidových plaků. Tyto výsledky potvrzují ochabování cholinergní transmise v průběhu přirozeného stárnutí a prokazují časné *in vivo* poškození centrálních cholinergních neuronů a přenosu signálu na cholinergních synapsích u tohoto myšího modelu Alzheimerovy nemoci. Ukazují také na terapeutický význam podporování muskarinové transmise, neboť její oslabení se kromě ochabování mentálních funkcí v průběhu přirozeného stárnutí projevuje také snížením neamyloidogenního štěpení bílkoviny prekursor amyloidu a může tak být jednou z příčin zvýšené tvorby β -amyloidu u sporadických případů onemocnění. (Machová, E. - Jakubík, J. - Michal, P. - Oksman, M. - Livonen, H. - Tanila, H. - Doležal, V.: Impairment of muscarinic transmission in transgenic APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Aging*. 29, 3, (2008), 368-378. (IF = 5.607)).
5. Lokální změny koncentrace vápenatých iontů rozhodujícím způsobem určují časový průběh kvantového výlevu na chemických synapsích. Tyto změny však nelze na savčím nervosvalovém spojení měřit přímo (vzhledem k velmi malým rozměrům synapsí), a proto se výzkum soustřeďuje na co nejpřesnější teoretický odhad kinetiky

koncentračních změn. V rámci dlouhodobé spolupráce s Ústavem biochemie a biofyziky Ruské Akademie věd v Kazani byly vytvořeny matematické modely vápníkových pufrů a výlevu kvant neuropřenašeče a byly experimentálně prověřené na nervosvalové synapsi. Nyní lze pochopit některé významné detaily synaptického zpoždění, které podmiňují rychlost neuropsychických dějů a zásadně přispívají k menší či větší reakční rychlosti v kritických životných situacích. (Skorinkin, A.I. - Shaihutdinova, A.R. - Vyskočil, F.: *Model of concentration changes across the synaptic cleft during a single quantum release. Gen Physiol Biophys.* 27, (2008), 19-24. (IF = 1.286), Gilmanov, I.R. - Samigullin, D.V. - Vyskočil, F. - Nikolsky, E.E. - Bukharaeva, E.A.: *Modeling of quantal neurotransmitter release kinetics in the presence of fixed and mobile calcium buffers. J Comput Neurosci.* 25, 2, (2008), 296-307. (IF = 1.928)).

6. Ve spolupráci s italskými partnery (Univerzitou v Boloni) jsme publikovali výsledky detailní analýzy, která se zabývala vlivem idebenonu (syntetického analogu koenzymu Q rovněž používaného v lékařské praxi) na oxidační rychlosti dvou flavoprotein-zavislých substrátů: glycerol-3-fosfátu a sukcinátu, tří NADH-zavislých substrátů: pyruvátu, 2-oxoglutarátu a β -hydroxybutyrátu, a na oxidaci palmitoyl karnitinu. Ačkoli podání koenzymu Q či idebenonu může být prospěšné při léčbě některých patologických procesů, objevila se v odborné literatuře řada důkazů, že analogy koenzymu Q nemohou zcela nahradit přirozený koenzym Q, protože se při reakcích s různými dehydrogenázami dýchacího řetězce chovají odlišně. V naší studii jsme zjistili, že idebenone výrazně aktivoval glycerol-3-fosfátovou oxidaci, zatímco sukcinátová oxidace nebyla signifikantně ovlivněna. NADH-závislé substráty i palmitoyl karnitin byly idebenonem inhibovány v různém rozsahu: nejvyšší inhibici jsme zaznamenali u pyruvátu, nejnižší u 2-oxoglutarátu. Studie potvrzuje různý vliv na jednotlivé mitochondriální komplexy, což je třeba vzít v úvahu při případném terapeutickém užití idebenonu. (Rauchová, H. - Drahotová, Z. - Bergamini, C. - Fato, R. - Lenaz, G.: *Modification of respiratory-chain enzyme activities in brown adipose tissue mitochondria by idebenone (hydroxydecyl-ubiquinone). J Bioenerg Biomembr.* 40, 2, (2008), 85-93. (IF = 2.634)).
7. V rámci analýzy specializovaných typů svalových vláken jsme spolu s kolegy z University v Lipsku popsali pomocí kvantitativní histochemie 6 typů svalových vláken v okoohybných extraokulárních svalech (EOM) potkana. Tyto typy vláken, jak pomalých tak i rychlých, byly charakterizovány specifickým metabolickým profilem, a jak bylo prokázáno, rychlá svalová vlákna vykazovala neobvyklou kombinaci vysoké aktivity aktomyozinové ATPázy spolu s vysokou aktivitou glykolytických (GPDH) i oxidativních (SDH) enzymů. Toto je kombinace, která se mezi kosterními vlákny normálně nevyskytuje

a která těmto vláknům zajišťuje nejen schopnost rychlé kontrakce, ale i vysokou odolnost k únavě. Díky tomu, jsou EOM schopny plnit širokou škálu fyziologických úkonů, včetně extrémně rychlých a dlouhotrvajících pohybů. Autoři vyslovili hypotézu, že tato kombinace, výjimečná mezi vlákny kosterní svaloviny, je pravděpodobně umožněna tím, že svalová vlákna EOM, díky anatomickým poměrům oka, nepotřebují vyvinout velkou sílu při své kontrakci. (*Asmussen, G. - Punkt, K. - Bartsch, B. - Soukup, T.: Specific metabolic properties of rat oculorotatory extraocular muscles can be linked to their low force requirements. Invest Ophthalmol Vis Sci. 49, 11, (2008), 4865-4871. (IF = 3.528)*).

IV. Hodnocení další a jiné činnosti:

FGÚ AV ČR, v.v.i. se v roce 2008 věnoval své hlavní činnosti.

V. Informace o opatřeních k odstranění nedostatků v hospodaření a zpráva, jak byla splněna opatření k odstranění nedostatků uložená v předchozím roce:

V roce 2008 ústav hospodařil dle schváleného rozpočtu. Audit hospodaření neshledal žádné nedostatky.

VI. Finanční informace o skutečnostech, které jsou významné z hlediska posouzení hospodářského postavení instituce a mohou mít vliv na její vývoj:

Účetní jednotka nepoužívá investiční instrumenty ani další obdobná aktiva a pasiva. Neexistují tedy skutečnosti, které jsou významné z hlediska posouzení hospodářského postavení instituce a které by mohly mít vliv na její vývoj.

VII. Předpokládaný vývoj pracoviště:

Vývoj činnosti ústavu v následujících letech se nemůže výrazně odchýlit od základní činnosti definované ve zřizovací listině a dané výzkumným záměrem. V průběhu řešení výzkumného záměru během posledních let byla získána řada významných výsledků, které by měly být dále analyzovány i v příštích letech. Jedná se především o studium mechanismů podílejících se na vzniku řady společensky závažných chorob (epilepsie, obezity, hypertenze, ischemické choroby srdeční,

Alzheimerovy demence, apod.). Specifickým rysem bude studium většiny uvedených patofyziologických změn ve vývojovém kontextu se zvláštním zřetelem k možnému poškození organismu v ranných fázích ontogenetického vývoje. Dále bude pokračovat rozpracovávání výsledků získaných v oblasti chronobiologie, studia paměti a bolesti, energetického metabolismu ale i neurohumorálních regulací a molekulárních mechanismů přenosu signálů. I nadále bude snahou ústavu podporovat výzkum v oblasti aplikací a to hledání nových materiálů pro cévní a kostní náhrady, hledání nových postupů při aplikaci protinádorových léčiv a spolupráce v oblasti využití rybích olejů v prevenci obezity. Hlavními výstupy budou vědecké publikace v mezinárodních časopisech, prezentace na domácích a mezinárodních sympoziích a kongresech a popularizační články v odborném tisku.

Nedílnou součástí činnosti ústavu bude spolupráce s vysokými školami v pregraduální výuce i v doktorských studijních programech. Bude pokračovat úsilí pracovníků popularizovat vědu ať už formou vědeckých sympozií, tak i účastí v diskusních pořadech či formou popularizačních článků ve sdělovacích prostředcích. I nadále bude ústav hlavním garantem školení stědoškoláků a vysokoškoláků pro práci s laboratorními zvířaty ve smyslu zákona na ochranu zvířat proti týrání a navazující legislativy EU.

Vedení ústavu ve spolupráci s příslušnými vědeckými odděleními podniká konkrétní kroky v úsilí o vybudování pracoviště, které by získalo akreditaci k provádění testací léčiv a chemických látek. Vzhledem k tomu, že je nutné splnit přísné legislativní požadavky, má tento úkol dlouhodobější charakter. V roce 2009 by mělo dojít k přípravě zadávací dokumentace k žádosti o stavební povolení a územní rozhodnutí tak, aby (pokud to finanční možnosti dovolí) v průběhu roku 2010 mohla být zrealizována přestavba bývalé budovy „psince“ na moderní laboratoře.

VIII. Aktivity v oblasti ochrany životního prostředí:

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i. se podílí na třídění odpadu v rámci areálu Krč a jako každý rok i v roce 2008 předal Odboru životního prostředí v Praze 4 informaci o nakládání s odpady. Ústav ve spolupráci se specializovanými firmami kromě běžných odpadů zajišťuje sběr a recyklaci dalších nebezpečných odpadů jako např.:

- použité baterie
- roztoky vývojek a aktivátorů
- roztoky ustalovačů
- zdravotní odpad
- etidium bromid

- injekční jehly
- skleněné lahve od chemikálií
- rozpouštědla
- teploměry a další odpad s obsahem rtuti
- lednice a mrazáky

Pracovníci ústavu vybudovali v roce 2008 vlastními silami a za finanční pomoci ústavu umělý biotop k rozmnožování chráněné ropuchy zelené popř. dalších obojživelníků.

IX. Aktivity v oblasti pracovněprávních vztahů:

- vytváříme zaměstnancům pracovní podmínky, které umožňují bezpečný výkon práce (zlepšení vzhledu a úpravy pracovišť, údržbu a zlepšení zařízení)
- zajišťujeme preventivní zdravotní péči
- pro vlastní potřebu i pro potřebu dalších vědeckých pracovišť vyhledáváme a vychováváme jako školící pracoviště, zejména ve spolupráci s vysokými školami, vysoce kvalifikované vědecké pracovníky
- vytváříme vhodné pracovní podmínky pro zaměstnávání mladých vědeckých pracovníků, dále cizinců jak z Evropské unie, tak z třetích zemí
- umožňujeme vědeckým pracovníkům, kteří jsou již delší dobu ve starobním důchodu se i nadále věnovat vědě (emeritní člen)
- umožňujeme prohlubování a zvyšování kvalifikace
- dbáme o bezpečnost a ochranu zdraví zaměstnanců
- umožňujeme vynikajícím mladým vědeckým pracovníkům, kteří se vrací z dlouhodobého pracovního pobytu v cizině a mají zájem pracovat v FGÚ, vybudování vlastního oddělení
- zajišťujeme zaměstnancům cenově zvýhodněné stravování ve vlastní závodní jídelně

I když povaha a charakter práce v ústavu nedává moc možností zaměstnávat osoby se zdravotním postižením, snažíme se alespoň pomáhat organizacím, které zaměstnávají více než 50% těchto osob tím, že od nich odebíráme výrobky a služby. V roce 2008 jsme odebrali výrobky celkem za 837 874,- Kč.

razítko

Akademie věd ČR
 FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV, v.v.i.
 142 20 Praha 4-Krč, Vídeňská 1083

1


 podpis ředitele FGÚ AV ČR, v.v.i.

Přílohou výroční zprávy je účetní závěrka a zpráva o jejím auditu