

Popis řešení projektu v roce 2006

Centrum základního výzkumu LC 06034 Regulace morfogeneze rostlinných buněk a orgánů (REMOROST)

Řešitelská pracoviště:

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

Cíl projektu

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

Anotace projektu

Základem růstu a morfogeneze rostlin jsou striktně časově a prostorově regulované procesy buněčného dělení, růstu, a tvarových změn (buněčná morfogeneze) a posléze proces 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.

Informace o nákupu investičních prostředků v roce 2006:

UEB:

- Konfokální mikroskop a vybavení na pokročilou konfokální mikroskopii - Zeiss (14,8 mil. Kč)
- Mikrocentrifuga Eppendorf 5424 - dodavatel Lab Mark a.s. (74 tis. Kč)
- Upgrade fluorescenčního mikroskopu (DSU systém, Olympus) na pracovišti ÚEB AVČR v Olomouci (887 tis. Kč)

UK: ---

MU:

- Systém pro automatickou mikroskopii „slide“ firmy Olympus, cena po slevě 2,1 mil. Kč (sleva cca 1,2 mil. Kč)
- Příslušenství k mikroskopu (cca 0,3 mil. Kč)
- Nákup FPLC (Akta FPLC, GE Healthcare, cca 1,1 mil. Kč)
- Systém pro homogenizaci rostlinného materiálu Qiagen TissueLyser (cca 0,1 mil. Kč)

VSCHT:

- Orbitální termostatovaný inkubátor OTSILLEU1 C s osvětlením pro pěstování suspenzních buněčných kultur (dodavatel firma Schoeller Instruments) (429 tis. Kč)

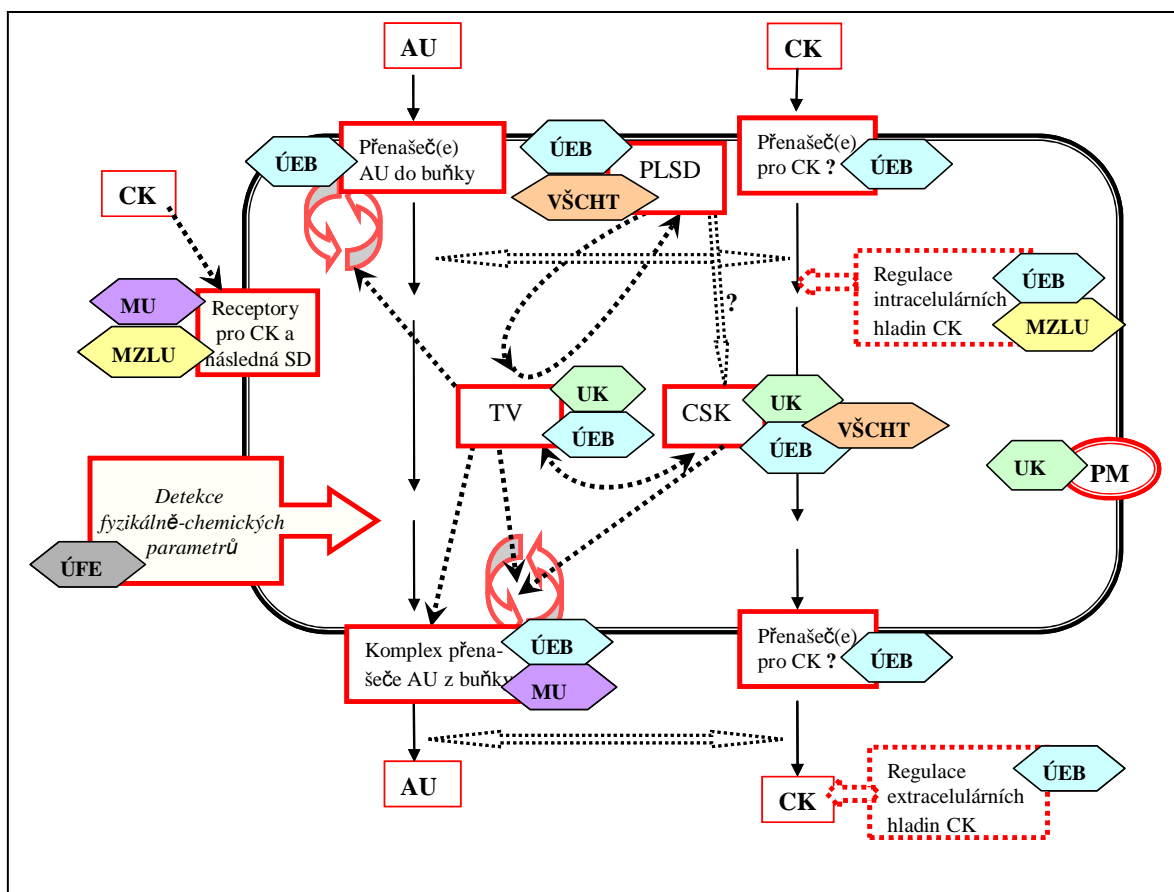
MZLU:

- Avanti J-30I (laboratorní vysokootáčková chlazená centrifuga s rotory)
 - AKTA FPLC s Frac-950 (vysokoučinná chromatografie proteinů)
 - Kultivační skříň AR36L
 - DP70 (CCD kamera pro mikroskopii)
- (celkem 3,57 mil Kč)

URE:

- Vlákenný spektrometr ANDO AQ6315A (542 tis. Kč)

Schematické znázornění řešení problematiky
s označením zapojení jednotlivých partnerských organizací



AU = auxiny; CK = cytokininy; CSK = cytoskelet; PLSD = fosfolipidová signální dráha; PM = plasmatická membrána; SD = signální dráha; TV = transport váčků;

↻ = cyklování mezi PM a endosomy. Plné šipky = tok látek, tečkované šipky = regulační vztahy.

Informace o postupu prací v roce 2006 a plán na rok 2007

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Stručné informace o postupu prací v roce 2006 jsou přiřazeny níže k příslušným dílčím cílům spolu s informací, která z partnerských institucí je za příslušný dílčí výsledek zodpovědná. Rozdělení řešené problematiky do dílčích cílů je čistě formální a mnohé oblasti výzkumu spadají pod dva i více dílčích cílů.

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

Dílčí cíl V006 byl z důvodů logického uspořádání zařazen 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. Nicméně v rámci Centra budou organizována minisymposia věnovaná dílčí problematice Centra a tato minisymposia budou zařazována pod dílčí cíl V008.

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

V roce 2006 nebyla prováděna měření na rostlinných buňkách, protože zatím nebyl připraven příslušný experimentální materiál. Fluorescenční studie byly prováděny na živočišných a bakteriálních buňkách (spektrofluorometr, konfokální mikroskop Leica, fluorescenční mikroskop Olympus Cell-R) a byly zavedeny a rozvíjeny metody a přístupy, které budou aplikovány v příštím roce na rostlinné buňky. Byla provedena měření vstupu vápníku do buněk poměrovým měřením sondou FURA na fluorometru a pomocí sondy FURA Red a Fluo4 na fluorescenčním mikroskopu Cell-R. Byla srovnána využitelnost konfokálního mikroskopu Leica a fluorescenčního mikroskopu Cell-R pro sledování endocytosy fluorescenčně značených proteinů. Bylo zavedeno měření membránového potenciálu pomocí sondy DiSC₃(5). Mgr. Fišer zkonstruoval zařízení umožňující v mikroskopu Jenamed 2 měřit anisotropii fluorescence s cílem měřit vzájemné interakce membránových proteinů značených GFP (green fluorescence protein) pomocí ovlivnění anisotropie fluorescence přenosem energie mezi těmito proteiny. (UK)

- viz též další dílčí cíle

Plány na rok 2007:

Optimalizace fluorescenčních kvantitativních metod pro charakterizaci dynamiky endocytosy vybraných proteinů, měření membránového potenciálu a stanovení reaktivních forem kyslíku na experimentálních modelech pylových láček tabáku a buněčných suspenzí tabáku BY-2 a Arabidopsis (UK)

V002:

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

Charakterizace funkce proteinů PIN: Důležitými faktory pro mezibuněčný transport fytohormonu auxinu jsou proteiny PIN, které jsou specifické pro rostliny, a některé transportéry typu MDR/PGP z rodiny ABC-transportérů, které se obecně vyskytují v buňkách bakterií, hub, rostlin i živočichů. I když byly proteiny rodiny PIN vždy považovány za klíčové „facilitátory“ polárního transportu auxinů na úrovni přenosu auxinů z buňky, jejich vlastní molekulární funkce nebyla známa. S využitím indukovatelné exprese genů *PIN* a *PGP19* a kvantitativních měření akumulace auxinů v buňkách Arabidopsis a tabáku kultivovaných *in vitro* jsme prokázali, že proteiny PIN vymezují rychlost přenosu auxinů z buněk, že je jejich působení specifické vůči auxinům a citlivé vůči inhibitorům transportu auxinu. Dále jsme zjistili, že funkce proteinů PIN se v některých kvalitativních i kvantitativních aspektech liší od působení transportéru *PGP19*. Naše poznatky svědčí pro přímou funkci proteinů PIN v katalyzování exportu auxinů z buněk a pro to, že v rostlinách jsou dvě různé, na sobě nezávislé cesty přenosu auxinů z buňky - PIN-dependentní a *PGP*-dependentní. Spolu s kolegy ze spolupracujících zahraničních pracovišť (Laboratoř Dr. Frimla, Univ. Tübingen, Německo, Lab. Prof. Murphyho, Purdue Univ., USA, Lab. Dr. Geislera, Univ. Zurich, Švýcarsko, a Lab. Dr. Luschniga, University of Natural Resources and Applied Life Sciences-BOKU, Vídeň, Rakousko) jsme ukázali, že proteiny PIN umožňují export molekul auxinů i z kvasinek a savčích buněk, aniž by zde byly třeba další rostlinné faktory. Tyto poznatky svědčí pro funkci proteinů PIN jakožto vlastních přenašečů auxinů z buňky

(Petrášek et al., Science 2006). **(UEB, spolupráce s MU a s výše uvedenými zahraničními pracovišti)**

Pokračovali jsme v charakterizaci funkce proteinu PaLAX1 (kandidát na přenašeč auxinu do buňky z *Prunus avium*, který je částečně homologní s přenašečem auxinu do buňky z *A. thaliana* - permeasou AUX1). Byly dokončeny pokusy o komplementaci mutanta *aux1* (loss-of-function) genem PaLAX1. PaLAX1 není schopen mutanta *aux1* plně komplementovat, což je v souladu s jeho předběžným zařazením do sice příbuzné, ale nikoli stejné genové rodiny jako gen AUX1. Transgenní linie *Arabidopsis* nesoucí gen PaLAX1 byly kříženy s linií IAA2::GUS. Odezva IAA2 na endogenní hladinu IAA prostřednictvím modrého zbarvení byla analyzována u rostlin F1-generace potomstva z tohoto křížení (Hoyerová et al. připravováno pro „resubmission“). **(UEB)**

Připravujeme různé transgenní linie tabáku a Arabidopsis, nesoucí geny pro přenašeče auxinů do buňky (geny rodiny AtPIN (PIN1, 4, 5, 6) a gen AtPGP19) a gen pro možný receptor auxinů AtABP1 pod indukovatelnými promotory. Jednotlivé linie jsou v současné době v různých fázích přípravy - od prvních kroků po transformaci až po ustavení relativně stabilních linií, kde probíhá již jejich ověřování a charakterizace (spadá i pod dílčí cíl V001). **(UEB)**

Plány na rok 2007:

Izolace a charakterizace hypotetického proteinu vázajícího nekompetitivní inhibitory polárního transportu auxinů, charakterizace mechanismu(ů) působení fytotropinů **(UEB)**

Charakterizace endocytotického kroku konstitutivního cyklování proteinů PIN v buněčných kulturách tabáku a *Arabidopsis* **(UEB ve spolupráci s Univ. Tübingen, UK a MU)**

Pokračování v přípravě různých transgenních linií tabáku a *Arabidopsis*, nesoucích geny pro přenašeče auxinů do buňky a gen pro možný receptor auxinů AtABP1 pod indukovatelnými promotory (spadá částečně také pod dílčí cíl V001 a V005) **(UEB)**

Charakterizace specifických inhibitorů přenašeče(čů) auxinu do buňky **(UEB)**

Příprava konstruktů nesoucího gen PaLAX1 v translační fúzi s RFP (red fluorescence protein) a získání příslušných transgenních linií **(UEB)**

Odvození dobře rozpadavých buněčných linií z kontrolních rostlin *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia a z mutanta *aux1* **(UEB)**

V003:

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

Zavádění metody purifikace rostlinného komplexu exocyst: Podmínkou pro pokusy o purifikaci exocystu jsou protilátky proti některým jeho podjednotkám, které umožňují sledovat pozici podjednotek v jednotlivých frakcích po aplikaci separačních postupů. Dosud se nám podařilo připravit polyklonální protilátky proti podjednotkám Sec3, Sec5, Sec6 a díky spolupráci s laboratoří Johna Fowlera (Oregon State University, Corvallis, USA) jsme získali také protilátku proti podjednotce Sec8. Předběžné pokusy s rozdělovací chromatografií na extraktech kvěťáku ukázaly, že použitý postup ústí v kolokalizaci podjednotek, což napovídá, že komplex je opravdu vytvořen a za daných podmínek se nerozpadá. V průběhu roku jsme pak přešli na použití extraktů ze suspenzních buněk *Arabidopsis*, vzhledem k tomu, že všechny protilátky byly připravovány proti rekombinantním bílkovinám *Arabidopsis*. Úspěšně byl zařazen krok iontově výměnné chromatografie a v současnosti se pokoušíme ještě zařadit krok vstupní frakcionace na hydroxyapatitu. Při iontově výměnné chromatografii jsme ovšem

zaznamenali oslabení podílu podjednotky Sec5, což naznačuje možné obtíže při pokusech o purifikaci intaktního komplexu. (UEB)

Využití 2hybridního systému v kvasince k hledání interaktorů podjednotek exocystu: Byl proveden screening cDNA knihoven Arabidopsis s cílem vyhledat proteiny interagující s podjednotkami komplexu exocyst. Dosud se podařilo ověřit tři kandidáty, kteří interagovali také po retransformaci. Byly připraveny první 2-hybridní konstrukty odvozené od forminů. Probíhá optimalizace metody detekce exprimovaných fúzních proteinů v buňkách kvasinek. V rámci tohoto přístupu jsme také začali testovat možné interakce exocystu s GTPázami. (UEB, UK)

Plány na rok 2007:

Budeme pokračovat v optimalizaci postupu pro purifikaci komplexu exocyst. V případě úspěchu se pokusíme identifikovat některé bílkoviny v purifikovaných frakcích pomocí proteomických metod. To by mohlo mít také velký význam pro nalezení nových interaktorů. (UEB)

U interaktorů nalezených 2-hybridním přístupem se pokusíme mj. získat také inzerční mutanty v Arabidopsis. (UEB)

Bude pokračovat také klonování a charakterizace dalších podjednotek exocystu. (UEB)

Budeme pokračovat v genetické i biochemické analýze regulátorů malých GTPáz. (UEB)

V004:

Charakterizovat struktury cytoskeletu a jejich úlohu v dílčích morfogenních procesech

Studium polární lokalizace γ -tubulinu v pozdních fázích mitózy: Byly navrženy primery a klonovány některé vybrané geny Ran GTPáz. Byly popsány změny v polární lokalizaci γ -tubulinu v pozdních fázích mitózy a jejich vliv na správný průběh cytokineze. Bylo využito ovlivnění modelových organismů látkami měnícími průběh buněčného cyklu. Rovněž jsme využívali vhodného transformovaného materiálu s cílenými změnami v průběhu buněčného cyklu. Byly prováděny především imunolokalizační studie a analýzy *in vivo* s využitím GFP-transformantů a lipofilních membránových barviv. Na základě těchto studií byl připraven rukopis publikace o významu γ -tubulinu pro acentrozomální nukleaci mikrotubulů (Cenklová et al., rukopis v přípravě). (UEB)

Plány na rok 2007:

Budou klonovány další příslušné geny RanGTPáz a interagujících proteinů, budou připraveny GFP-fúze a RNAi verze těchto genů, budou transformovány buňky a především rostliny *A. thaliana*. Využijeme tranzientní exprese vyklonovaných genů v listech, v protoplastech s využitím PEG transfekce, případně využijeme particle bombardment techniky, rovněž budeme provádět stabilní transformace rostlin *A. thaliana*. Zahájíme charakterizaci fenotypů při eliminaci jednotlivých Ran GTPázových proteinů pomocí RNAi. Současně budou provedeny imunolokalizační experimenty sledující distribuci RanGTPáz a interagujících proteinů včetně analýz *in vivo*. Bude provedena analýza proteinových interakcí vybraných GTPáz. (UEB)

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

V uplynulém roce jsme se zaměřili na fosfolipasu C specificky štěpící fosfatidylcholin (PC-PLC) a na receptor pro inositoltrisfosfát (Krinke et al., J.Exp.Bot. v tisku). V jediné, dosud publikované práci z roku 2005 je funkce tohoto enzymu spojována s reakcí buňky na nedostatek fosfátů. Naše předběžné výsledky nicméně ukazují, že je PC-PLC i signálním proteinem. Byly studovány expresní profily PC-PLC po ošetření rostlin auxiny, cytokininy a kyselinou abscisovou. Dále byla zahájena charakterizace inzerčních T-DNA mutantů *A. thaliana* pro všech šest genů *PC-PLC*. (**UEB**)

Úloha fosfolipidové signální dráhy v morfogenezi rostlinných buněk: Byla zahájena charakterizace inzerčních T-DNA mutantů *A. thaliana* pro geny fosfolipasy D (PLD), fosfolipasy C (PLC) a fosfatidylinositol 4-kinasy, naše kolekce byla doplněna o linie s inzertem v genech pro diacylglycerol kinasu (DAGK). Přehled jednotlivých inzerčních T-DNA linií a stavu rozpracovanosti je uveden v tabulce. Zároveň byly díky mezinárodní spolupráci získány dva dvojitě mutanty: jeden pro PI 4-kinasu typu β (současný knock-out genů *PI4K β 1* a *PI4K β 2*) a druhý pro PLD typu ζ (současný knock-out genů *PLD ζ 1* a *PLD ζ 2*). Mutantní linie pro jednotlivé isoformy PI 4-kinas budou v blízké době využity k nalezení isoformy PI 4-kinasy, která je aktivována v odpovědi na kyselinu salicylovou (SA), jako příklad rostlinného hormonu. Aktivaci PI 4-kinasy po působení SA jsme prokázali v práci, která byla nedávno odeslána do tisku (Krinke et al. submitted). Tato aktivace vede k významnému nárůstu fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu, který je jednak modulátorem aktivity PLD a ovlivňuje též dynamiku aktinového cytoskeletu. (spadá též do dílčího cíle V004) (**VSCHT**)

Tabulka Stav charakterizace jednotlivých inzerčních T-DNA linií.

Jméno genu	Kód genu	Linie T-DNA	Stav charakterizace
PLD α 1	At3g15730	SALK_053785	dokončeno
PLD α 2	At1g52570	GABI_212E06	probíhá
PLD β 1	At2g42010	SALK_079133	dokončeno
PLD β 2	At4g00240	SALK_113607	probíhá
PLD γ 1	At4g11850	SALK_066687	dokončeno
PLD γ 2	At4g11830	SALK_089965	probíhá
PLD γ 3	At4g11840	SALK_084335	probíhá
PLD δ	At4g35790	SALK_023247	probíhá
PLD α 4	At1g55180	SALK_017905	není objednáno
PLD α 3	At5g25370	SALK_130690	není objednáno
PLD ζ 1	At3g16785	SALK_083090	dokončeno
		SALK_094369	dokončeno
PLD ζ 2	At3g05630	SALK_119084	dokončeno
PLD ζ _double	-	-	darováno (Arnould Savouré)
PLC1	At5g58670	SALK_025769	dokončeno
PLC2	At3g08510	SALK_152284	probíhá
PLC3	At4g38530	SALK_054406	dokončeno
PLC4	At5g58700	GABI_832F07	není objednáno
PLC5	At5g58690	SALK_144469	dokončeno
PLC6	At2g40116	GABI_104C08	dokončeno
PLC7	At3g55940	SALK_044778	dokončeno
		SALK_030333	dokončeno
PLC8	At3g47290	SALK_150154	není objednáno
PLC9	At3g47220	SALK_025949	není objednáno

DAGK1	At5g07920	SALK_053412	dokončeno
DAGK2	At5g63770	SALK_063328	dokončeno
PI4K α 2	At1g51040	SALK_046774	probíhá
PI4K β 1	At5g64070	SALK_040479	dokončeno
PI4K β 2	At5g09350	SALK_098069	dokončeno
PI4K β _double	-	-	darováno (Erik Nielsen)

Studium interakce PLD s tubulinem: Dvojitý knock-out mutant genů *PLD ζ 1* a *PLD ζ 2* bude především sloužit jako negativní kontrola k potvrzení interakce PLD s tubulinem pomocí měření aktivity PLD ζ (PXP ϕ PLD) *in vitro* v přítomnosti tubulinu. Na základě známé regulace aktivity lidské fosfolipasy D2 interakcí s tubulinem a existující homologie tubulin-vázající domény hPLD2 s rostlinnou PLD ζ 1,2 předpokládáme interakci i možnou regulaci aktivity rostlinné PLD ζ 1,2 interakcí s tubulinem. První výsledky naznačují dvojnásobné zvýšení aktivity tohoto enzymu po vzájemné interakci. (spadá též do dílčího cíle V004) **(VSCHT)**

Interakci jiné isoformy fosfolipasy D β (C2PLD) s monomerním a polymerním aktinem jsme prokázali v práci, která bude v nejbližších dnech odeslána do časopisu *FEBS Letters*. V práci jsme ukázali, že Ca²⁺ hraje důležitou úlohu při těchto *in vitro* interakcích. Zatímco F-aktin v přítomnosti vápenatých iontů zvýšil aktivitu PLD, G aktin ji naopak snížil. Dále jsme provedli sekvenční analýzu domény vázající aktin u eukaryotických fosfolipas D. Výsledky ukazují na možnost, že interakce fosfolipasy D β s aktinem je zprostředkována určitými konservovanými aminokyselinovými zbytky v PLD doméně vázající aktin. (spadá též do dílčího cíle V004) **(VSCHT)**

Specifická funkce vybraných PLD pylových láček tabáku: V pylu tabáku (podobně jako *Arabidopsis*) se exprimuje řada paralogů PLD. Pomocí techniky PCR s degenerovanými primery se podařilo získat částečné sekvence cDNA dvou fosfolipáz typu D aktivních v tabákovém pylu. Byla zavedena technika RACE pro doplnění chybějících částí sekvencí, probíhají PCR a sekvenování jednotlivých zajímavých produktů. Částečných sekvencí získaných z pylových láček tabáku pomocí RT-PCR jsme využili k návrhu antisense-oligonukleotidů, které specificky inhibují PLD β či PLD δ (spadá i pod dílčí cíl V004). **(UEB, UK)**

NADPH oxidasy jako potenciální hráč v PLD/PA signalizaci: Byla klonována a sekvenována parciální cDNA sekvence NADPH oxidasy, která je přítomna v pylu tabáku. Ve spolupráci s týmem UEB byla zavedena metodika in-gel assay pro stanovení aktivity NADPH oxidázy zejména v kontextu modulace genové exprese pomocí transfekce rostoucích láček antisense oligonukleotidy, které byly navrženy na základě zjištěné sekvence. Publikace je v přípravě. **(UK)**

NADPH oxidasy a reaktivní formy kyslíku (ROS) v polárním růstu pylových láček: Na rostoucích špičkách pylových láček řady druhů krytosemenných rostlin byla zjištěna tvorba reaktivních forem kyslíku podobně, jako tomu je u rostoucích kořenových vlásků. Protože tato aktivita je brzděna DPI, který inhibuje NADPH-závislé oxidázy (NOX), hledali jsme zprvu bioinformatickými prostředky příslušné oxidázy v transkriptomu pylu *Arabidopsis*. Zjistili jsme, že pyl obsahuje specifickou podtřídu NOX a pomocí degenerovaných primerů a PCR se nám podařilo naklonovat příslušné homology z pylu tabáku. Zavedli jsme také metodiku stanovení aktivity NADPH oxidasy po separaci nativní elektroforézou v gelu. Tato metoda a PCR nám umožnily prokázat, že při použití modifikovaných antisense-oligonukleotidů jsme schopni specificky potlačit genovou expresi a také aktivitu NOX v pylových láčkách. To je spojeno s poklesem produkce ROS na špičce a zpomalením růstu láček. Tato práce má také velký metodický význam, protože komplexně dokumentuje funkčnost dosud málo využívané metody inhibice genové exprese pomocí antisense-oligonukleotidů u rostlin. Zjistili jsme také, že aktivita pylových NOX je silně stimulována vápníkem. Publikace je zaslána do tisku (Potocký et al. submitted). **(UEB)**

PA fosfatasy: Bylo zjištěno, že propranolol, inhibitor PA fosfatasy, stimuluje růst pylových láček podobně jako sama kyselina fosfatidová. Bylo provedeno bioinformatické vyhodnocení dostupných informací o počtu a expresním profilu PA fosfatáz u *Arabidopsis* a jejich sekvence porovnány s dostupnými sekvencemi z čeledi *Solanaceae*. Na základě těchto informací byla zaklonována a osekvenována kompletní CDS PA fosfatázy z pylu tabáku a byly navrženy antisense oligonukleotidy pro potlačení exprese genu. (UK)

Interakce mezi hormony a geny KNOX v časném vývoji semenáčků *Arabidopsis thaliana*: Rostlinné hormony řídí vývoj rostlin modulací exprese specifických regulačních genů. Je zkoumána hormonální regulace genové exprese rodiny KNOX genů *Arabidopsis thaliana*. Vedle aplikace exogenních hormonů je ke zvýšení hladin endogenních cytokininů (CK) využit systém regulovatelné genové exprese - pOp-ipt/LhGR. Působení exogenních hormonů (auxin, kyselina abscisová, cytokininy, etylén a gibereliny) nevyvolalo ektopickou expresi genu BP. Expese BP byla silně snížena působením kyseliny abscisové, naproti tomu auxiny ji zvyšovaly v korelaci s auxiny indukovanou iniciací meristémů postranních kořenů, v nichž je BP silně exprimován. Expese BP nebyla významně ovlivněna krátkodobým exogenním působením ostatních testovaných hormonů na úrovni celistvých semenáčků. Orgánově specifická diferenciální regulace exprese KNOX genů byla pozorována v průběhu krátkodobé indukce IPT (isopentenytransferasy, vstupního enzymu biosyntézy cytokininů). Zatímco expese několika KNOX genů byla indukována do nízkého stupně, specifické potlačení exprese STM bylo pozorováno v hypokotylech. Toto potlačení exprese STM bylo daleko výraznější při nízkých intenzitách světla. Dlouhodobé působení CK vedlo ke zvýšení hladin několika KNOXI transkriptů v hypokotylech. Pozorované zvýšení korelovalo s radiální expanzí vaskulárních pletiv, které jsou hlavní doménou exprese KNOXI genů. Z toho lze usuzovat, že cytokininy mají pouze malý nebo žádný přímý vliv na aktivitu promotorů KNOXI genů v hypokotylech. Citlivost k působení hormonů nebyla změněna u mutanta se ztrátou funkce genu BP. Konstitutivně zvýšená expese genu BP vedla k redukcí délky a počtu postranních kořenů, zatímco hlavní kořen nebyl ovlivněn. Tyto semenáčky vykazovaly nízké, ale průkazné změny v citlivosti k působení kyseliny abscisové, cytokininů a prekursoru etylénu. Zajímavým zjištěním je skutečnost, že indukce exprese genů indukovatelných působením cytokininů byla pozorována v kotyledonech dříve než došlo k indukci IPT, což svědčí o rychlém transportu cytokininů z jiných částí semenáčku. (MZLU)

Regulace genové exprese u rodiny AHP genů *Arabidopsis thaliana*: U vyšších rostlin se dvoukomponentní systém účastní přenosu signálu některých hormonů a reakcí na stres nebo změnu světelných podmínek. Faktory s přenašečovou doménou (AHP) transportují fosfátovou skupinu z receptorů umístěných v membránách na regulátory odpovědi. Doposud bylo identifikováno 5 AHP faktorů. Metodou RT-PCR v reálném čase je studován vliv cytokininů na expresi rodiny AHP genů v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*. Byl srovnáván rozdíl v působení exogenně aplikovaných aromatických cytokininů a cytokininů isoprenoidního typu produkovaných enzymem isopentyltransferasou (IPT). Po aktivaci exprese IPT byl zaznamenán výrazný nárůst derivátů trans-zeatinu a pouze minimální změny v množství ostatních isoprenoidních cytokininů. K přechodnému nárůstu exprese AHP1-4 došlo po krátkodobém působení jak aromatických tak i isoprenoidních cytokininů. Pokud však byly semenáčky kultivovány dlouhodobě v přítomnosti cytokininů, byl pozorován nárůst exprese pouze po aplikaci aromatických cytokininů a nikoliv při dlouhodobé indukci exprese IPT. Toto zjištění je dalším nepřímým důkazem rozdílných účinků aromatických a isoprenoidních cytokininů. (MZLU)

Analýza struktury a funkce AHP proteinů: V rostlině *Arabidopsis thaliana* bylo popsáno šest genů kódujících HPT proteiny (histidine-containing phosphotransmitter - proteiny přenášející fosfát přes histidin). Pět z těchto šesti genů (*AHP1-5*) kóduje proteiny s konzervovaným histidinem a šestý (*AHP6*) obsahuje místo histidinu asparagin. Vyhledáváním v cDNA

knihovných *Arabidopsis* se nám podařilo získat úplnou cDNA všech šesti *AHP* genů a naklonovat ji do různých expresních vektorů. Tyto vektory byly transformovány do expresních kmenů *E. coli* a byla analyzována hladina jejich exprese. Všechny proteiny se podařilo získat v rozpustné frakci; proteiny *AHP1-3* a *AHP5* jsou produkovány s relativně vysokou výtěžností, na rozdíl od proteinů *AHP4* a *AHP6*, u nichž je výtěžek exprese nízký. Proto byla a je realizována řada nových expresních screenů, které by mohly vést ke zvýšení produkce obou proteinů. V současné době je také optimalizována purifikace *AHP* proteinů pomocí FPLC. Předpokládáme, že i přes nízké výtěžky *AHP4* a *AHP6* se nám podaří připravit všechny *AHP* proteiny v množství a čistotě potřebné pro jejich krystalizaci. Paralelně byly připraveny polyklonální králičí protilátky proti všem uvedeným *AHP* proteinům. Králíci byli imunizováni peptidy simulujícími vybrané epitopy *AHP* proteinů tak, aby mezi nimi nevznikala křížová reakce. V současné době jsou připravené protilátky testovány. (MU)

Role předpokládané receptorové histidinkiny *CKI1* v regulaci vnímání cytokininů u rostlin, příprava homozygotních linií se sníženou expresí *CKI1* a jejich fenotypová analýza: Byla provedena selekce transgenních linií homozygotních pro konstrukt umožňující represi exprese genu *CKI1* mechanismem RNA-interference (RNAi). U těchto rostlin byly zjištěny zajímavé fenotypové projevy a v současné době probíhají podrobnější analýzy korelace zjištěných fenotypových projevů s mírou exprese *CKI1* pomocí Q RT PCR. Tyto výsledky budou součástí společné publikace se spolupracujícím pracovištěm z Jižní Korey (Dr. Ildoo Hwang) a Biofyzikálním ústavem AV ČR v Brně (doc. Brzobohatý), jejíž rukopis v současnosti připravujeme. (MU)

Příprava EMS knihovny pro detekci mutantů se změnou exprese genu *CKI1*: Byla provedena EMS mutagenese a vysetí cca 1.800 transgenních linií *Arabidopsis thaliana*, nesoucích konstrukt s markerovým genem *uidA* pod kontrolou promotoru genu *CKI1* (*pCKI1::uidA*). Byla sebrána semena jednotlivých linií a v současnosti probíhá analýza expresního vzorce genu *CKI1* u jednotlivých mutančních linií pomocí systému pro automatickou mikroskopii „slide“. Jedná se pravděpodobně o první využití tohoto systému pro tyto aplikace a předpokládáme i metodickou publikaci na toto téma. V současné době jsme pomocí systému „slide“ dokončili analýzu asi 250 linií a identifikovali jsme přibližně 20 linií s odchylkami v expresi *CKI1*, které lze rozdělit do cca 8 fenotypových tříd. V současné době probíhá jednak analýza zbývajících linií, jednak podrobnější genetická i molekulární analýza již identifikovaných linií s předpokládanou změnou exprese *CKI1*. (MU)

Analýza vztahů mezi strukturou a funkcí proteinů podílejících se na přenosu cytokininového signálu, analýza struktury a funkce přijímačové domény *CKI1*: Byla purifikována přijímačová doména *CKI1* (RD - receiver domain) v čistotě a množství potřebném pro krystalizaci proteinu. Pro analýzu mechanismu přenosu signálu pomocí *CKI1* jsme klonovali část genu *CKI1*, kódující tzv. přijímačovou doménu *CKI1* a provedli její expresi v *E. coli*. Ve spolupráci s dr. Lubicou Urbaníkovou z Ústavu molekulární biologie SAV v Bratislavě byla tato doména krystalizována. Krystaly však vykazovaly dvojitou symetrii, a proto se v současné době zaměřujeme na optimalizaci technik, které by vedly k získání kvalitnějších krystalů. (MU)

Proteomická analýza raných odpovědí na cytokininy: Recentně byly publikovány výsledky, ukazující na poměrně rychlé změny v genové expresi bezprostředně po aplikaci exogenních cytokininů. V současné době připravujeme analýzu změn proteomu v raných stádiích po aplikaci exogenních cytokininů, což by nám mělo umožnit identifikovat cílové proteiny zprostředkovávající rané odpovědi rostlinných buněk na zvýšenou hladinu exogenních cytokininů. (MU)

Analýza interakcí cytokininů a auxinů a jejich role při morfogenezi rostlin *de novo*: Pro identifikaci molekulární podstaty vzájemných interakcí mezi cytokininy a auxiny, které jsou kritické pro výsledný morfogenní efekt, jsme se rozhodli využít hypokotylový test v kombinaci s mikroskopickou a biochemickou analýzou. Použili jsme celou řadu různých

markerových linií, jejichž podrobnou mikroskopickou analýzu právě dokončujeme. Získané výsledky ukazují na dosud nezjištěné procesy během hormonálně podmíněné morfogeneze u rostlin *de novo* a naznačují jejich obecnou platnost a univerzalitu hormonálně podmíněných vývojových programů i během přirozené ontogeneze. V současnosti tyto výsledky sumarizujeme a předpokládáme jejich publikování během příštího kalendářního roku. **(MU)**

Role symplastických polí pro morfogenezi primární kůry kořene: Byla optimalizována metodika detekce adhezivních domén plasmalemy a buněčné stěny. Protože lze předpokládat, že lokalizace těchto domén je v primární kůře určena hlavně frekvencí políček plasmodesmů, tak byla použita jako jedno z kritérií, pro vyhodnocení preferenčního směru komunikace buněk primární kůry během diferenciacce. Tato charakteristika byla doplněna lokalizací kalosy, pro níž byl optimalizován postup fixace a imunolokalizace. **(UK)**

Značení plasmodesmů virovými „movement proteiny“ *in vivo*: Jsou připravovány transgenní linie pro značení plasmodesmů s využitím virových „movement proteinů“ fúzovaných s fluorescenčními proteiny. Ty umožní kvantifikaci a vytvoření plasmodesmogramů, podél osy vyvíjejícího se kořene. **(UK)**

Plány na rok 2007:

Příprava a charakterizace T-DNA mutantů *A. thaliana* pro všech šest genů PC-PLC (pokračování), případně příprava dvojitých mutantů. Dokončena bude studie expresních profilů po ošetření rostlin rostlinnými hormony. Ve spolupráci s VŠCHT bude studována role PLD v přenosu cytokininových signálů. **(UEB)**

Dokončení charakterizace chybějících T-DNA mutantů enzymů fosfoinositidového signálního systému, získání dostatečného množství semen **(VSCHT)**

Identifikace a charakterizace fosfolipas účastnících se přenosů signálů cytokininů resp. auxinů **(VSCHT)**

Studium interakce fosfolipasy D (PLD ζ 1,2) s tubulinem *in vitro* **(VSCHT)**

Získání kompletnějších sekvencí zejména jednotlivých izoforem PLD (pokračování) - se zaměřením na vyhledávání interakcí těchto proteinů zejména pomocí kvasinkového dvouhybridního testu a zkoumání zapojení funkce těchto proteinů v signálních kaskádách polárního růstu. **(UK)**

Charakterizace klonů získaných z 2-hybridního screeningu cDNA knihoven a identifikace dalších interagujících proteinů touto metodou. **(UK)**

V souvislosti s NOX a tvorbou ROS v pylových láčkách bude rozpracována metoda sledování spotřeby kyslíku rostoucími láčkami tabáku a budou dále studovány možné funkce ROS v růstu láček, také v možné interakci se signalizací spojenou s aktivitou PLD. **(UEB)**

Analýza struktury a funkce AHP proteinů - pokračování **(MU)**

Genetická i molekulární analýza transgenních linií *A. thaliana* s předpokládanou změnou exprese *CKI1* **(MU)**

Analýza struktury a funkce přijímačové domény *CKI1* - pokračování **(MU)**

Určení specifity cytokininových receptorů z *A. thaliana* (*AHK2*, *AHK3* a *CRE1/AHK4*) z hlediska vztahů mezi strukturou a aktivitou nových cytokininových derivátů a jejich antagonistů. Studium funkce cytokininů v regulaci buněčného cyklu, a to na úrovni jeho komponent, např. cdk, cyklinů, přirozených proteinových inhibitorů cdk a rovněž *CDC25-fosfatas* **(UEB)**

Proteomická analýza raných odpovědí na cytokininy - pokračování **(MU)**

Dokončení dokumentace a vyhodnocení orientace adhezivních domén a jejich změn během diferenciacce kořene. Ověřit lokalizaci kalosy do polí plasmodesmů na úrovni EM **(UK)**

Pokračování přípravy transgenních linií pro lokalizaci plasmodesmů *in vivo* **(UK)**

Pokračování studia interakce mezi hormony a *KNOX* geny v časném vývoji semenáčků *Arabidopsis thaliana* **(MZLU)**

Pokračování analýzy regulace genové exprese u rodiny AHP genů *Arabidopsis thaliana* (MZLU)

V007:

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

Farnesylace isopentenyltransferasy, vstupního enzymu biosyntézy cytokininů: Ve spolupráci s laboratoří Prof. W. Gruissem (Swiss Federal Institute of Technology, Curych) bylo zjištěno, že jeden z devíti enzymů zapojených do biosyntézy cytokininů (*AtIPT3*) je post-translačně farnesylován. Sledování exprese fluorescenčně značeného enzymu (*GFP-AtIPT3*) v rostlinách *Arabidopsis* ukázalo, že na farnesyl-positivním pozadí (WT) je enzym směřován do jádra, zatímco při expresi na farnesyl-negativním pozadí (mutant *era1-2*) je enzym akumulován v plastidech. Náhrada farnesyl-vazebného cysteinu v CaaX motivu serinem v molekule *IPT3* blokovala nejen farnesylovaní, ale též katalytickou aktivitu enzymu. Jedná se o první zjištění duální funkce vazebného cysteinu v prenylaci a katalytické aktivitě isoprenylovaného enzymu. Zvýšená exprese *IPT3* je spojena s akumulací isoprenoidních cytokininů a to zejména N7-glukosidu isopentenyladeninu (*iP7G*). Metabolická přeměna primárních produktů biosyntézy cytokininů na biologicky neaktivní *iP7G* představuje jeden z klíčových mechanismů hormonální homeostáze v rostlinách *Arabidopsis*. (UEB)

Role polárního transportu auxinu v uvolňování pupenů z apikální dominance: Objasnění genetického základu, který podmiňuje růst a vývoj rostlin, se prudce rozvíjí. Jako příklady je možno uvést polarizace osy apex-báze u embryí, tvorba primordií orgánů z buněk stonkového apikálního meristému (*SAM*) a jejich prostorové umístění - fylotaxe, polarita a tvar listů a dále vývojové přechody, jako jsou juvenilní - dospělé listy, přechod z vegetativního do reprodukčního vývoje a velmi důkladně prostudovaný vývoj kořene. Pro všechny tyto procesy jsou společným jmenovatelem gradienty auxinu mezi jednotlivými skupinami buněk, umožňované polárním transportem auxinu, který je zprostředkován skupinou *PIN/AUX* proteinů. Jedním z vývojových procesů u rostlin, který je studován již více než 100 let je apikální dominance a s ní související přechod inhibovaného (dormantního) axilárního pupene do aktivního růstu po dekapitaci rostliny, který stále není zcela objasněn. Proto byl v axilárních pupenech a ve stonku sledován polární transport auxinů (*PAT*) pomocí radioaktivně značených auxinů a pomocí imunolokalizace *PIN1*, po uvolnění z apikální dominance. Dále byly sledovány změny exprese genů účastnících se polárního transportu auxinu (*PIN1* a *AUX1*) a genu účastnícího se udržování dormance pupenu (*DRM1*) v axilárních pupenech během uvolňování z apikální dominance. Uvolnění z apikální dominance je prováděno jednak dekapitací a také aplikací cytokininu na axilární pupen intaktní rostliny. Je také studována možnost udržení apikální dominance náhradou odstraněného apexu aplikací auxinu a vliv této aplikace na změny genové exprese v axilárních pupenech. (MZLU)

Do linií umožňujících regulovatelnou expresi genu pro biosyntézu cytokininů (*CaMV 35S>GR>ipt* linie) byl pomocí křížení vnesen transgen pro detekci tvorby lokálních maxim auxinů (*DR5::GUS* a *DR5rev::GFP*). Byla provedena fenotypová analýza vývojově specifické odpovědi těchto linií na indukci endogenních hladin cytokininů jak na úrovni změny morfologie a růstu kořene, tak na úrovni změn v tvorbě lokálních maxim auxinů. (MU)

Vyvinutí/optimalizace metod potřebných pro stanovení rostlinných hormonů a měření aktivity enzymů jejich metabolismu:

Byla vyvinuta metoda electrospray liquid chromatography-mass spectrometry (LC-ESI-MS) s detekčním limitem okolo 100 fmol. IAC umožnila rychlou, jednostupňovou přípravu vzorků

před touto analýzou. Technologie LC-ESI-MS a LC-ELISA byly použity pro srovnávací stanovení hladin endogenní kyseliny abscisové v imunoafinitně přečištěných extraktech z listů normálních a vodou stresovaných rostlin *Nicotiana tabacum* L. Tento analytický přístup byl validován pomocí deuteriem- a tritiem-značených interních standardů. IAC se ukázala jako vysoce efektivní, citlivá a pohodlná metoda pro izolaci cílového analytu z rostlinným materiálu (Hradecká et al., J. Chromatogr. v tisku). **(UEB)**

Dále se nám podařilo vyvinout metodu ELISA pro měření 24-epikastasteronu a příbuzných brasinolidových analog s detekčním rozsahem od 0.005 do 50 pmol. Polyklonální protilátky používané v tomto testu byly připraveny proti konjugátu 24-epikastasteron carboxymethyloximu s hovězím sérovým albuminem a vykazovaly velmi vysokou specifitu pro 24-epibrasinosteroidy. Přírodní brasinosteroidy (BR), např. brasinolid a 24-epibrasinolid, vykazovaly relativně vysoké křížové-reaktivity s připravenými protilátkami, kdežto ostatní BR analoga s β -orientovanými hydroxylovými skupinami na C-2, C-3, C-22, a C23 ztrácely imunoreaktivitu. Za použití interní standardizace, zřed'ovacích testů, recovery autentického [³H]24-epikastasteronu a imunohistogramů jsem prokázali, že ELISA je aplikovatelná pro stanovení hladiny 24-epibrasinosteroidů v čistých rostlinných extraktech. Rovněž byla vyvinuta vysoce citlivá technologie založená na LC-ESI-MS (LOD: 50 fmol) a výsledky byly porovnány s HPLC-ELISA (Swaczynová et al., J. Plant Growth Regul. v tisku). **(UEB)**

Pro experimentální modelové organismy, zvolené pro řešení problematiky Centra (tabák, *Arabidopsis thaliana*), byla optimalizována radioizotopová metoda stanovení aktivity cytokininoxidasy/dehydrogenasy (CKX) in vitro. Přidáním elektronových akceptorů (např. 2,6-dichloroindofenolu) do reakční směsi bylo dosaženo výrazného zvýšení citlivosti metody umožňující detekovat aktivitu CKX už v miligramových množstvích rostlinného materiálu při zachování nízké koncentrace substrátového cytokininu (na rozdíl od dříve popsáných kolorimetrických technik) a přibližující tak podmínky stanovení *in vitro* skutečnému fyziologickému stavu rostliny (Sýkorová et al., 2006 poster). Mezi oběma experimentálními modely (tabák, *Arabidopsis*) byly uvedeným postupem zjištěny rozdíly v substrátové specifitě CKX (na základě kompetičních testů i s využitím radioaktivně značených substrátových cytokininů) týkající se zejména degradace *trans*- a *cis*-zeatinu (předběžné výsledky). **(UEB)**

Plány na rok 2007:

Stanovení vlivu zvýšené exprese *IPT3* na farnesyl-positivním a farnesyl-negativním pozadí na změny fenotypu rostlin *Arabidopsis*. **(UEB)**

Stanovení vlivu zvýšené exprese *IPT* a *CKX* na hladiny a metabolismus *cis*-zeatinu, prověření možnosti degradace *cis*-zeatinu aktivitou CKX. **(UEB)**

Molekulární determinace substrátové specifity beta-glukozidáz uvolňujících aktivní cytokininy z jejich O-glukozidů. **(MZLU)**

Role vakuoly v procesu reverzibilní glukozylace cytokininů, jednoho z prvků jejich homeostáze. **(MZLU)**

Studium expresních profilů PsDRM1, PsAD1, PsPIN1 a PsAUX1 a imunolokalizace PsPIN1 v pupenech, které jsou po dekapitaci dominantním vyrůstajícím pupenem opět inhibovány. Vliv různého způsobu vymanění z apikální dominance (dekapitací, aplikací cytokinnu na axilární pupen intaktní rostliny, aplikace inhibitoru polárního transportu auxinu na stonek) na změny genové exprese v axilárních pupenech. **(MZLU)**

Bude provedeno dokončení fenotypových a molekulárních analýz kříženců linií CaMV 35S>GR>ipt a DR5::GUS (CaMV 35S>GR>uid A). Ve spolupráci s Centrem biostatistiky a analýz (CBA) MU bude provedeno statistické vyhodnocení dosažených výsledků, které budou publikovány v mezinárodním časopise. **(MU)**

Sledování příjmu a metabolismu značených cytokininů (derivátů isopentenyladeninu a zeatinu) v izolovaných chloroplastech tabáku. **(UEB)**

Vývoj nových technologií pro stanovení auxinů, které budou založeny na generických protilátkách pro auxiny, tzn. že budou schopny vázat velké množství metabolitů IAA. Tyto protilátky budou využity k přípravě imunokolon a následné purifikaci vzorků imunoafinitní chromatografií a k analýze HPLC/MS/MS. (UEB)

Zavedení mikrodisekce jednotlivých rostlinných buněk a optimalizace analýz rostlinných hormonů na buněčné úrovni pomocí UPLC/MS/MS. Tato technologie bude aplikována poprvé na svěřacích buňkách průduchů u rostlin vystavených stresu suchem. (UEB)

Vývoj nových technologií pro stanovení brasinosteroidů v transgenních rostlinách a mutantech *A. thaliana*. Tyto technologie by měly být založeny na co nejkompaktnějších analýzách metabolitů brasinosteroidů s využitím imunoafinitní chromatografie a UPLC/MS/MS. (UEB)

V006:

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

V průběhu prvního roku řešení byly práce na projektu, v souladu s plánovanými úkoly, zaměřeny na teoretickou analýzu vhodných typů vláknového taperu (rozměry zúžení a špičky vlákna), na experimentální přípravu vhodných taperů, na jejich mechanickou ochranu, na mechanické opracování jejich konců (řez, zkosení) a na identifikaci vhodných převodníků ve vazbě na volbu vhodné metody optické detekce. Závěry teoretické analýzy tvarů adiabatického taperu jsou shrnuty v disertační práci (Martan 2006). Součástí této práce bylo i dokončení experimentálního zařízení umožňujícího praktickou přípravu a vývoj technologie tažení taperů na základě tváření křemenných skel plamenem. S využitím této technologie byly experimentálně připraveny vzorky taperů vláken. Pro srovnání byly též připraveny vzorky řízeným odleptáváním vláken směsí kyselin. Jako nejvhodnější se ukázala leptací směs HF:HNO₃:H₂O v poměru 1:1:1. Celkově však bylo dosaženo lepších vlastností (zejména mechanických) postupem založeným na plamenovém tváření. Byl vyvinut postup mechanické ochrany připravených taperů spočívající v jejich dodatečném pokrytí vhodnou polymerní vrstvou neprodleně po ukončení tvarovacích procesů (maximálně desítky sekund). Byly vypracovány postupy pro zpracování taperů - řezání zúžené části (s průměrem cca jednotek mikrometrů) a její zabrušování pod definovaným úhlem pomocí lapovacích filmů.

Alternativně byl též vyvíjen postup přípravy detekčních elementů založených na jiném typu optického vlákna (Solařík et al. 2006 a,b). Cesta optických taperů se však na základě provedených prací ukázala jako nosná. Výsledky získané v oblasti vývoje optického hardwaru byly souhrnně prezentovány ve zvané přednášce v Maďarsku (Kašík et al. 2006).

Na základě analýzy literatury o optických detekčních metodách byl pro tento projekt, navržen jako vhodný fluorescenční princip detekce založený na měření změn fluorescenčních převodníků zachycených na jednovidovém taperu v reflexním uspořádání. S ohledem na tento přístup byly testovány pH fluorescenční převodníky fluorescein, 5(6)-carboxyfluorescein, 6,8-dihydroxy-1,3-pyrenedisulfonic acid disodium salt (Sigma-Aldrich 37920, DHPDS), 3-cyanoumbelliferone (Sigma-Aldrich 28605) a 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (Sigma-Aldrich 14560, BCECF). Byla změřena objemová absorpční a fluorescenční spektra těchto převodníků v roztoku o pH v očekávaném rozsahu. Výběr vhodných převodníků pro další postup vycházel z poměru intenzit absorpce a fluorescence pro příslušný rozsah pH (Podrazký et al. 2007 submitted) a z existence absorpčního pásu v oblasti, kde jsou dostupné čerpací zdroje. Jako nejvhodnější pracovní varianta byla zvolena kombinace čerpání laserovou diodou na vlnové délce 415 nm a převodníku DHPDS. Aby se

zabránilo zničení biologických vzorků vysokým optickým výkonem budícího záření (50 W) interagujícím s preparátem v omezeném prostoru ze špičky taperu, byla navržena pulzní modulace. (URE)

Plán na rok 2007:

V oblasti vláknových taperů bude pozornost dále soustředěna na vývoj metod přípravy taperů s dobrými mechanickými vlastnostmi a na vypracování technologických postupů, které umožní penetraci detekčního elementu skrz buněčnou stěnu.

Dále budou vyvíjeny metody pro imobilizaci převodníků na taper (fixace do polymerních vrstev nebo do vrstev tetraetoxysilanu připravených metodou sol-gel) a hledány nejvhodnější prostorové konfigurace imobilizovaných vrstev. Testování převodníků proběhne nejprve v modelových roztocích, posléze v reálných vzorcích.

Bude realizována pilotní optická sestava pro měření pH s jemným prostorovým rozlišením. Z vypracovaného návrhu vyplývá, že bude patrně nutné pracovat se systémem o mezní vlnové délce v oblasti krátkých vlnových délek (400-500 nm) pro dosažení stabilního jednovidového režimu. Pro tuto spektrální oblast však řada vláknově-optických komponent není běžně dostupná a bude nutné je experimentálně připravit, pro což má pracoviště vybavení a částečně i know-how. Na základě získaných výsledků bude navržen systém pro detekci ve fázovém závěsu, který bude prvním krokem k následné postupné optimalizaci citlivosti optického systému. (URE)

V008:

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

Plány na rok 2007:

V polovině roku 2007 bude zahájeno pravidelné setkávání členů řešitelských týmů centra. Setkání v roce 2007 bude organizováno řešitelským týmem MU. Účelem setkání bude vzájemná výměna informací o pokroku prací na jednotlivých dílčích cílech a jejich výsledcích, konzultace využitelných technologií a pracovních postupů a zejména průběžné propojování dosažených výsledků s cílem vytvořit komplexní model regulace morfogeneze rostlin.

Mezinárodní spolupráce (nově navázané):

Již delší dobu probíhající mezinárodní spolupráce všech partnerských pracovišť Centra jsou uvedeny v návrhu projektu. Zde jsou uvedeny pouze mezinárodní spolupráce nově zahájené:

Nově zahájené mezinárodní projekty:

UEB:

Prof. Günther Scherer (University of Hannover, Německo) a Dr. Jan Martinec (ÚEB): podán bilaterální projekt GAČR-DFG „Functional analysis of a novel phosphatidylcholine - splitting phospholipase C“.

Prof. Dominique van der Straeten (Ghent Univ., Belgie) a Dr. Eva Zažímalová (ÚEB): získán grant v rámci programu KONTAKT č. 1-2006-12: Elongace rostlinné buňky: integrace auxinového signálu s etylénem, brasinosteroidy a modrým světlem

UK:

Faculty of Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Polsko, prof. K. Strzalka: týdenní pobyt doc. Konopáska v Krakově, dokončení společné publikace, dvoutýdenní pobyt J. Beranové v Krakově - měření na diferenciálním skenovacím kalorimetru

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Rosario, Argentina, prof. Diego de Mendoza: týdenní pobyt prof. C. Mansilla v Praze - konzultace o pokračování společných pokusů

VSCHT:

V rámci řešení problematiky zabývající se interakcí fosfolipas se strukturami cytoskeletu byla navázána spolupráce s prof. Arnould Saviouré z university CNRS FRE2846, Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes, Ivry sur Seine, France). Jeho laboratoř se zabývá suchostresem a rostlinnými fosfolipasami.

URE:

Byla zahájena nová mezinárodní spolupráce s Université de Rennes na tématice nových nanočástic pro fotoniku. Jejím cílem je hledat způsoby posílení fluorescence pomocí nanostruktur pro zvýšení citlivosti vláknových sensorů. Spolupráce byla potvrzena zahájením doktorátu pod dvojitým vedením J. Mrázka.

Dále byly hledány možnosti případné spolupráce s IPHT Jena (P. Tobiška) v oblasti modelování a technologie vláknových taperů pro detekci pH.

Publikované práce

(vypracované v rámci Centra nebo s přispěním Centra, přiřazené v databázi RIV)

(jména pracovníků podílejících se na práci Centra jsou zvýrazněna, s výjimkou příspěvků na konferencích)

Články v impaktovaných časopisech:

Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wisniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, **Friml J**, Luschnig C (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the auxin efflux facilitator PIN2 in Arabidopsis is proteasomedependent and involved in root gravitropism. - Nature Cell Biology 8: 249-256 (IF 19,7)

Friml J, Benfey P, Benková E, Bennett M, Berleth T, Geldner N, Grebe M, Heisler M, **Hejácítko J**, Jurgens G, Laux T, Lindsey K, Lukowitz W, Luschnig C, Offringa R, Scheres B, Swarup R, Torres-Ruiz R, Weijers D, **Zazimalova E** (2006) Apical-basal polarity: why plant cells don't stand on their heads. - Trends in Plant Science 11: 12-14 (IF 9,7)

Hradecká V, Novák O, **Havlíček L**, **Strnad M**: Immunoaffinity chromatography of abscisic acid combined with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. - J. Chromatogr. (v tisku) (IF 3,1)

Kiran NS, Polanska L, **Fohlerová R**, **Mazura P**, **Válková M**, Šmeral M, Zouhar J, Malbeck J, Dobrev P, Macháčková I, **Brzobohatý B** (2006) Ectopic over-expression of the maize beta-glucosidase Zm-p60.1 interferes with cytokinin homeostasis in transgenic tobacco. - J. Exp. Bot. 57: 985-996 (IF 3,3)

- Krinke O, Novotná Z, Valentová O and Martinec J:** Inositol trisphosphate receptor in higher plants—is it real? - *J. Exp. Bot.* (v tisku) (IF 3,3)
- Mazura P, Fohlerová R, Brzobohatý B, Kiran NS, Janda L** (2006) A new sensitive method for enzyme kinetic studies of scarce glucosides. - *J. Biochem. Bioph. Meth.* 68: 55-63 (IF 1,2)
- Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertová D, Wisniewska J, Tadele Z, Kubeš M, Čovanová M, Dhonukshe P, Skůpa P, Benková E, Perry L, Křeček P, Lee OR, Fink GR, Geisler M, Murphy AS, Luschnig C, Zažímalová E, Friml J:** PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. - *Science* 312: 914-918, 2006 (IF 30,9)
- Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wiśniewska J, Reinöhl V, **Friml J**, Benková E (2006) Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feed-back regulation of PIN polarity. *Genes & Development* 20: 2902-2911 (IF 15,6)
- Swaczynová J, Novák O, Hauserová E, Fuksová K, Šiša M, Kohout L, Strnad M:** New techniques for the estimation of naturally occurring brassinosteroids. - *J. Plant Growth Regul.* (v tisku) (IF 2,7)
- Šebela M, Štosová T, Havliš J, Wielsch N, Thomas H, **Zdráhal Z**, Shevchenko A (2006) Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. - *Proteomics* 6: 2959-2963 (IF 6,1)
- Tvrzová L, Schumann P, Spröer C, Sedláček I, Páčová Z, Šedo O, **Zdráhal Z**, Steffen M, Lang Elke (2006) *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2657-2663 (IF 2,7)
- Zažímalová E, Křeček P, Skůpa P, Hoyerová K, Petrášek J:** Polar transport of plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. - Vyžádaný přehledný článek do *Cell. Mol. Life Sci.*, „conditionally accepted“ („after minor revision“) (IF 4,8)

Disertační práce:

- T. Martan:** „Generation of supercontinuum in nonlinear microstructure optical fibre“, disertační práce ČVUT-FEL, 2006, anglicky

Další články:

- Brewer P, Heisler M, **Hejátko J, Friml J**, Benková E (2006) In situ hybridization for mRNA detection in *Arabidopsis* tissue sections. - *Nature Protocols* 1: 1462-1467
- Hejátko, J.**, Blilou, I., Brewer, P.B., **Friml, J.**, Scheres, B. and Benková, E. : *In situ* hybridisation technique for mRNA detection in whole mount *Arabidopsis* samples. - *Nature Protocols* 1: 1939-1946, 2006
- Kamínek M, Sýkorová B, Hoyerová K, Motyka V:** Mechanisms controlling cytokinin homeostasis in plant cells. - In: *Essays on Phytohormones and Signalling in Plants*. K. Laukens, L. Roef, E. Witters, eds., University of Antwerp, ISBN 90-5728-067-1, pp. 149-165, 2006

Rukopisy v recenzním řízení:

- Hradilová, J., Malbeck, J., Brzobohatý, B.:** Cytokinin regulation of gene expression in the AHP gene family in *Arabidopsis thaliana*. - Submitted, 2006
- Krinke O., Ruelland E., Valentová O., Renou J.-P., Flemr M., Burketová L., Zachowski A.:** The *Arabidopsis* salicylic acid-responsive transcriptome is regulated by phosphatidylinositol 4-kinase. - Submitted (Plant J.)
- Potocký M, Jones M, Bezvoda R, Smirnov N, Žárský V:** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. - Submitted, 2006
- Souček, P., Klíma, P., Reková, A., Brzobohatý, B.:** Cross-talk between hormones and *KNOX* genes in early *Arabidopsis* seedling development. - Submitted, 2006
- Spíchal L, Kryštof V, Paprskářová M, Lenobel R, Stýskala J, **Binarová P, Cenklová V**, De Veylder L, Kontopidis G, Fischer PM, Schmölling T, **Strnad M:** Classical anticytokinins do not interact with cytokinin receptors, but inhibit cyclin-dependent kinases. - J. Biol. Chem., submitted, 2006

Články v přípravě - do impaktovaných časopisů:

- Cenklová V, Pochylová Ž, Binarová P:** Polar localization of γ -tubulin during late mitosis is cell cycle regulated and essential for regular progression through cytokinesis.
- Dhonukshe P, Aniento F, Ortiz-Zapater E, Hwang I, Robinson DG, **Klíma P, Seifertová D, Mravec J, Stierhof Y-D, Zažímalová E and Friml J:** Clathrin-mediated endocytosis of plasma membrane cargos in plants
- Hoyerová K, Perry L, Hand P, Kottová J, Kocábek T, May S, Napier R, Zažímalová E:** Characterization of *PdLAX1* Function in *Arabidopsis* and Tobacco. - (připravováno pro "resubmission" - Plant Physiol.)
- Linek J., Křeček P., Potocký M., Martinec J., Valentová O., Žárský V., Novotná Z.:** Regulation of plant PIP2-dependent phospholipase D activity by actin. Bude odesláno do časopisu FEBS Letters

Příspěvky na konferencích:

Přednášky:

- Kašík I., Matějec V., Chomát M., Berková D., Hayer M., Mrázek J., Podrazký O.:** „Optical fibers for optical sensing“, Advanced Study Course on Optical Sensing - ASCOS 2006, Tihany, Hungary, September 2006, invited lecture.
- Hejátko J, Ryu H, Borkovcová P, Kim GT, Souček P, Palme K, Brzobohatý B, Hwang I (2006)** Constitutive CKI1 activity modulates cytokinin signaling and regulates vascular tissue development in *Arabidopsis*. 8-th International Congress of Plant Molecular Biology, 20. - 25. 8. 2006, Adelaide, Australia, Book of Abstracts, pg 66 (přednáška)
- Hoyerová, K., Jiřina, M., Zažímalová, E.:** Modeling mechanisms of cellular auxin transport. Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2: 17, 4. Metodické dny, Srní, říjen 2006, (přednáška)

- Potocký, M., Jones, M., Bezvoda, R., Smirnov N., Žárský, V.: Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. XIX. International Congress on Sexual Plant Reproduction, Budapest, Hungary, 11 - 16 July 2006 (přednáška)
- Žárský, V., Potocký, M., Jones, M., Cole, R.A., Bezvoda, R., Synek, L., Pícková, D., Fowler, J., Smirnov, N., Cvrčková, F., Hála, M.: Proteins and lipids regulating pollen tube expansion. XIX. International Congress on Sexual Plant Reproduction, Budapest, Hungary, 11 - 16 July 2006 (přednáška)

Postery:

- Cenklová V., Doskočilová A., Volc J., Bögre L., Binarová P.: Downregulation of γ -tubulin by RNAi in *Arabidopsis* plants revealed its role in acentrosomal microtubule nucleation. Book of abstracts: Plant biology 2006, (5.-9.8.2006, Boston, Massachusetts, USA): p 211, 2006.
- Cenklová V., Pochylová Ž., Vrlík M., Binarová P.: γ -Tubulin is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. Book of abstracts: XIV. Cytoskeletální klub, (17.-19.5.2006, Vranovská Ves), 2006.
- Čovanová M, Petrášek J, Zažímalová E. (2006) Protoplast swelling as a measure of auxin action in BY-2 tobacco cell culture. Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2: 54, 4. Metodické dny, Srní, říjen 2006
- Eyer L, Zdráhal Z, Šedo O, Konečná H, Pantůček R, Růžičková V, Preisler J, Hernychová L, Doškař J (2006) Proteom polyvalentního stafylokokového bakteriofága 812. In Sirotiak, Maroš. Študentská vedecká konferencia 2006. Zborník recenzovaných príspevkov - biologická a environmentálna sekcia. 1. zväzok. Bratislava : Univerzita Komenského v Bratislave, KARTPRINT od s. 41-43, 3 s
- Hála, M., Eliáš, M., Žárský V.: Rab escort protein of *Arabidopsis thaliana*: from cDNA to evolution of the REP/GDI superfamily. XVth congress of FESPB, Lyon 17-21 July, 2006.
- Hála, M., Eliáš, M., Žárský, V. : Rab prenylation in plants. SEB Plant Transport Group Meeting, Imperial College, Wye Campus, 4-6 September 2006.
- Hradilová, J., Malbeck, J., Brzobohatý, B.: Cytokinin regulation of gene expression in the *AHP* gene family in *Arabidopsis thaliana*. - In 3rd EPSO Conference, Book of Abstracts, Visegrád, Hungary, 28 May - 1 June 2006, p. 169
- Hradilová, J., Malbeck, J., Brzobohatý, B.: Cytokinin kinetics in binary system of inducible *ipt* expression and characterization of *AHP* gene family in *Arabidopsis thaliana*. - In 4. Metodické dny, 1. - 4. října 2006, Srní, Česká republika, Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 6(2) 2006, p. 62
- Kiran, N.S., Benková-Frimlová, E., Reková, A., Dubová, J., Malbeck, J., Raikhel, N.V., Brzobohatý, B.: Retargetting a maize beta-glucosidase: evidence from intact plants that zeatin-O-glucoside is stored in vacuole. - In XV FESPB Congress, Book of Abstracts, Lyon, France, 17-21 July 2006, p. 117.
- Kiran, N.S., Benková, E., Reková, A., Dubová, J., Malbeck, J., Brzobohatý, B.: Disrupting cytokinin metabolism *in vivo* by altering the subcellular location of a maize beta-glucosidase. - In 4. Metodické dny, 1. - 4. října 2006, Srní, Česká republika, Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 6(2) 2006, p. 7
- Kolouchová, T., Podhorská, R., Friml, J. a Hejátko, J. (2006) Automatická mikroskopie a poziční klonování v přístupech přímé genetiky. 4. metodické dny, Srní, 1.-4. 10., abstrakt v: Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 6, 23

- Křeček P, Zažímalová E. (2006) PIN protein family and auxin transport - A bioinformatic study. Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2: 75, 4. Metodické dny, Srní, říjen 2006
- Laňková M, Hoyerová K, Petrášek J, Perry L, Zažímalová E. (2006) Accumulation of radioactively labeled compounds as a tool for study of auxin influx. Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2: 76, 4. Metodické dny, Srní, říjen 2006
- Lenochová Z, Kuthanová A, Votrubová O, Opatrný Z, Soukup A: Použití TUNEL reakce pro detekci PCD v rostlinných pletivech a buněčných kulturách. - Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2, 4. Metodické dny, Srní
- Podrazký O., J. Mrázek, M. Seidl, I. Kašík, P. Tobiška, V. Matějec: Preparation and characterization of transducer layers for detection of auxins through cellular membrane, SPIE - Optical Sensors (COO105), Prague, April 2007, poster - submitted
- Simon S, Petrášek J, Laňková M, Skůpa P, Kubeš M, Zažímalová E. (2006) Accumulation Assay: A potent technique for assessing auxin efflux carrier specificity and affinity. Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2: 94, 4. Metodické dny, Srní, říjen 2006
- Skůpa P, Kubeš M, Seifertová D, Simon S, Petrášek J, Zažímalová E. (2006) Accumulation of radioactively labeled compounds as a tool for study of auxin efflux. Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2: 95, 4. Metodické dny, Srní, říjen 2006
- Solařík P., Z. Burian, I. Kašík, V. Matějec, J. Mrázek, M. Hayer: „Dielectric annular core fiber for optical sensing“ Photonics Europe. Strasbourg, April 2006, Book of abstracts 215 - poster, 2006a
- Solařík P., Z. Burian, I. Kašík, V. Matějec, J. Mrázek, M. Hayer: „Dielectric annular core fiber for optical sensing“ In Proceedings SPIE - The International Society for Optical Engineering. Bellingham : SPIE -The International Society for Optical Engineering, , 61891R.1-61891R.9, 2006b
- Sýkorová B, Dobrev PI, Kamínek M, Motyka V (2006): Increase in sensitivity of cytokinin oxidase/dehydrogenase radioisotope assay by introducing electron acceptor(s) to the reaction solution containing crude enzyme preparations. - Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin, 2: 81, 4. Metodické dny, Srní, říjen 2006
- Synek, L., Schlager, N., Elias, M., Quentin, M., Hauser, M-T., Žárský V.: AtExo70 family. EPSO conference, Visegrád 28 May- 1 June 2006.
- Šedo O, Vávrová A, Lexa M, Tvrzová L, Zdráhal Z (2006) Chemotaxonomic Characterisation of Pseudomonads by MALDI-TOF MS. In 17th International Mass Spectrometry Conference Abstract Book. Praha, ČR : Mikrobiologický ústav AVČR od s. 222-222, 1 s
- Vávrová A, Tvrzová L, Zdráhal Z, Šedo O, Lexa M, Švec P (2006) Využití MALDI-MS pro identifikaci Pseudomonas spp. In Tomáškovy dny mladých mikrobiologů. Brno, Česká republika : LF MU s. 33-33
- Žárský, V., Cole, R.A., Synek, L., Hála, M., Fowler, J.: Arabidopsis SEC6, SEC8 and SEC15 homologues are involved in pollen function and are part of a high molecular complex along with some other exocyst subunits. ASPB meeting Boston, 5-9 August 2006.

Další aktivity Centra:

V rámci Centra budeme pořádat cyklus metodicky zaměřených seminářů pro všechny pracovníky Centra i pro hosty z partnerských i dalších institucí.

První seminář **Dr. I. Konopáska a Mgr. R. Fišera (UK)** již proběhl (27.6.2006) a jeho program je přiložen níže:

seminář 27.6.2006:

„Co dnes přináší fluorescenční techniky v biologické laboratoři“

Přednášejí: **Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc. a Mgr. Radovan Fišer**
(Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká Fakulta UK, Praha)

Program:

- 1) Fluorescence jako metoda
 - a) sondy (firmy, membrány, proteiny, indikátory)
 - b) spektra (problém s autofluorescencí, polarita okolí, vazba iontů)
 - c) doba života (měření, naděje a problémy)
 - d) anizotropie (membrány, proteiny)
 - e) zhášení (dostupnost sondy)
 - f) FRET (pravítko pro nanosvět)
- 2) Fluorometry, fluorescenční spektroskopie dneška, kurzy, rutina a spektroskopie
- 3) Co jsme v naší skupině dělali a na co se chystáme, co je nám nedostupné:
 - a) jak zacházet s novou sondou, obvyklé problémy
 - b) konformace membránového proteinu
 - c) anizotropie, její vizualizace, FLIM
 - d) vstup vápníku do buněk (fluorometr a fluorescenční mikroskop)
 - e) membránový potenciál na plazmatické membráně a na membráně mitochondrie
 - f) endocytóza, konfokální mikroskop a fluorescenční mikroskop
 - g) membránový protein značený GFP, nečekané možnosti anizotropie
- 4) Diskuse

Další seminář je plánován na leden/únor příštího roku. Bude zaměřen na možnosti využití optických metod pro lokální detekci fyzikálně-chemických veličin pro studium buněčných struktur a jeho přípravy se ujal **Dr. Ivan Kašík (URE)**.