



Ústav experimentální botaniky
Akademie věd ČR

VÝROČNÍ ZPRÁVA

za rok
2005

Praha, leden 2006

1. VĚDECKÁ ČINNOST PRACOVISŤE A UPLATNĚNÍ JEJÍCH VÝSLEDKŮ:

a) stručná charakteristika vědecké činnosti pracoviště:

Ústav experimentální botaniky AV ČR se zabývá základním a cíleným výzkumem v genetice, fyziologii, patofyziologii a biotechnologiích rostlin. ÚEB v roce 2005 zahájil řešení výzkumného záměru s názvem *Mechanismy regulace růstu a vývoje rostlin na úrovni buněk, orgánů a celých organismů: fyziologické, genetické a molekulárně biologické základy* (AV0Z50380511, 2005-2010).

Cílem výzkumného záměru je přispět k objasnění základních mechanismů regulace růstu a vývoje rostlin, zejména v následujících oblastech: buněčný cyklus a dělení; diferenciací a morfogeneze buněk; fytohormony a další regulační látky – metabolismus, transport, mechanismus účinku; biologie pylu; buněčný transport váčků – komplex Exocyst; fosfolipidová signální dráha; regulační mechanismy ve fotosyntéze, vodním režimu a při reakcích na stresové podmínky a interakci s patogeny; mapování genomu; třídění chromosomů; lokalizace a funkce některých genů na chromosomech; poškození a reparace DNA; mutogeneze. Výzkum zaměřený na aplikace: testování syntetických inhibitorů buněčného cyklu (analogů cytokininů) pro léčení proliferativních onemocnění; exprese heterologních proteinů a jejich produkce (např. požitelné vakcíny) v transgenních rostlinách; příprava haploidních rostlin *in vitro* androgenezí pro šlechtění obilovin; zlepšení kvality obilovin transgenozí.

b) výčet několika nejdůležitějších výsledků vědecké činnosti a jejich aplikací:

- 1 Proteiny rodiny PIN jsou klíčovými faktory při auxinem regulovaných vývojových procesech u rostlin; jejich molekulární funkce však není známa. Byla provedena kvantitativní měření přenosu auxinu z buněk tabáku a *Arabidopsis* u buněčných linií overexprimujících geny rodiny PIN a bylo prokázáno, že působení proteinů PIN je specifické vůči biologicky aktivním auxinům a citlivé vůči inhibitorům polárního transportu auxinu ze skupiny fytotropinů (např. kyselina 1-natylftalamová). Kapacita exportu auxinů z buněk byla úměrná stupni exprese těchto proteinů. Získané experimentální údaje svědčí pro to, že proteiny PIN jsou přímou součástí molekulárního komplexu přenašeče auxinů z buňky a že limitují jeho kapacitu. **B**
- 2 Studovali jsme příčiny antiproliferační účinnosti nového inhibitoru cyklin-dependentních kinas olomoucínu II a analyzovali jsme jeho orientaci v krystalu CDK2. Inhibitor v buňkách silně stimuluje aktivitu nádorového supresoru p53. Dochází k translokaci p53 do jádra, kde indukuje expresi řady podřízených genů. Protein p53 je stabilizován inhibicí jeho negativního regulátoru, ubiquitinligasy Hdm2. Tento enzym byl v ošetřených buňkách přímo asociován s jadéřkovým proteinem L11, který výrazně blokuje aktivitu Hdm2. Tím docházelo ke stabilizaci p53. Translokace, respektive uvolňování L11 z jadérka, zřejmě souvisí s negativním efektem olomoucínu II na transkripci, řízené cyklin-dependentními kinasami CDK7, 8 a 9. Přímá inhibice CDK7 a zejména CDK9 byla ověřena s rekombinantními enzymy. **B**
- 3 S cílem umožnit analýzu molekulární struktury genomu pšenice jsme připravili subgenomickou knihovnu specifickou pro 1RS, klonovanou ve vektoru BAC. Při její konstrukci byl použit původní postup třídění chromozómů žita z adičních linií pšenice-žito za pomoci průtokové cytometrie. Jedná se o vůbec první BAC knihovnu pro žito. Malá velikost knihovny, daná zacílením na specifický úsek genomu, umožní efektivní izolaci důležitých genů. V současné době je knihovna využívána ke konstrukci fyzické mapy krátkého ramene chromozómu 1R a při charakterizaci oblastí bohatých na geny. **B**
- 4 Fyzické mapy genomů rostlin jsou obvykle sestavovány z částečně se překrývajících BAC klonů. Při sestavování map je důležité ukotvovat BAC klony na chromozómy. Lokalizace BAC klonů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je komplikována přítomností repetitivních sekvencí DNA. Vypracovali jsme nový postup, který ukotvování BAC klonů umožňuje. Postup spočívá v subklonování inzertů BAC klonů a identifikaci subklonů s minimálním obsahem repetitivních sekvencí. Jejich inzerty jsou pak lokalizovány pomocí FISH. **B**
- 5 Byl dokončen vývoj metodiky umožňující současné stanovení enzymových aktivit cytokininoxidázy/dehydrogenázy (CKX) a zeatinreduktázy (ZRED) v rostlinných pletivech. V rostlinách hrachu byla zjištěna kompetice obou enzymových aktivit při regulaci hladin cytokininů zeatinového typu a stanovena jejich úloha pro zachování hormonální homeostáze. Byla provedena částečná biochemická charakterizace CKX a ZRED izolovaných z pletiv hrachu. **B**
- 6 Tabáková fosfolipasa D β (PLD) (oblast aminokyselin 301 – 446) přímo asociuje s aktinem v obou jeho formách; G-aktin následně inhibuje aktivitu PLD, zatímco F-aktin vykazuje opačný efekt. Interakce PLD a aktinu je závislá na koncentraci Ca²⁺. Popsané asociace mohou hrát roli jak při regulaci aktivity PLD, tak i při interakcích plasmatické membrány s cytoskeletem. **B**
- 7 Charakterizovali jsme na molekulární úrovni první Rab escort protein (REP) rostlin a dokázali, že funguje jako podjednotka Rab geranylgeranyl transferázy. Bioinformatická i funkční analýza odhalila důležité rozdíly mezi REPy rostlin a živočichů (a kvasinek). Navrhli jsme novou hypotézu o evoluci celé nadrodiny REP/GDI (GDP disociační inhibitor) bílkovin v pre-eukaryotické buňce **B**
- 8 Byla zpracována databáze expresních profilů *Arabidopsis* Gene Family Profiler (*Arabidopsis*GFP)

(<http://arabidopsisgfp.ueb.cas.cz> nebo <http://agfp.ueb.cas.cz>). Databáze ArabidopsisGFP v kombinaci s dynamickými html stránkami napomáhá zpřehlednění velkého množství transkriptomických dat. Použitá data pocházejí z experimentů využívajících genové čipy Affymetrix ATH1. ArabidopsisGFP je databází divokých rostlin *Arabidopsis thaliana* studovaných za fyziologických podmínek. Nejsou zde zahrnuté mutanty, ani experimenty, které studují změnu exprese genů za modifikovaných fyzikálních, biologických či ekologických podmínek. Databáze ArabidopsisGFP využívá pro uložení a zpracování dat databázový server MySQL a přístup k ní je z webového rozhraní (IE/Netscape/Opera). **B**

- 9 Byla nalezena obecná korelace počtu kopií genu *LEAFY* s úrovní ploidie u rodu *Chenopodium*. Nebyla prokázána přítomnost druhého intronu v genomické sekvenci tohoto genu. Druhý intron v genu *LFY* byl nalezen dosud u všech zkoumaných vyšších rostlin, situace u rodu *Chenopodium* je unikátní. Byly nalezeny částečné sekvence genu *FT* a *TSF* (*Twin sister of FT*) u *C. rubrum* a dalších deseti druhů rodu. Předběžná fylogenetická studie prokázala přítomnost tří vývojových větví, dvě odpovídají dvojici FT-TSF, třetí dalšímu, zatím neurčenému členu této genové rodiny. Pomocí modifikovaného postupu 3'RACE byla nalezena úplná 3'sekvence genu *FT* u *C. rubrum*, experimenty 5'RACE k určení celkové sekvence cDNA pro *FT* probíhají. **B**
- 10 Technika RNA interference byla aplikována pro studium role rostlinného gamma-tubulinu. Pomocí funkčních *in vitro* polymerizačních esejů z extraktů, v nichž jsme eliminovali gamma-tubulin, jsme prokázali, že tento protein je nezbytný pro tvorbu mikrotubulů u acentrozomálních buněk rostlin. V buňkách tabáku, které exprimují nedegradovatelný mitotický cyklin B1, jsme sledovali vliv ektopické exprese mitotické cyklin dependentní kinázy na mikrotubulární cytoskelet v přechodu buněk z mitózy do cytokineze. Polární lokalizace gamma-tubulinu a některých membránových markerů je významným předpokladem pro správnou koordinaci mitotických a cytokinetických dějů. **B**
- 11 Ve spolupráci s laboratoří JIC v Norwichi jsme objevili klíčovou funkci Rho GDP disociačního inhibitoru 1 (RhoGDI) *Arabidopsis thaliana* v regulaci polarizovaného růstu kořenových vlásků spojeného s lokalizovanou aktivitou NADPH oxidáz a tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS). Mutant s bodovou mutací nám umožnil identifikovat oblast důležitou pro interakci RhoGDI s malými GTPázami Rop. **B**
- 12 Kromě calreticulinu 59 kDa obsahuje pyl tabáku ještě dvě minoritní isoformy calreticulinu o hmotnosti 50 kDa a další termotolerantní glykoprotein 64 kDa, který byl identifikován jako ubiquitin. Exprese termotolerantního calreticulinu 59 kDa probíhá na úrovni transkripce, translace a posttranslačních modifikací v různých fázích vývoje pylu. Zatímco transkripty se objevují již ve fázi mitózy mikrospor, termotolerantní forma bílkoviny se vyskytuje až v závěrečných fázích zrání a přetrvává do počátku klíčení pylu. Její termotolerance je spojena s vysokou glykosylací. **B**
- 13 Byl studován vliv biotického stresu způsobeného virovou infekcí na aktivitu fosfoenolpyruvátkarboxylasy (PEPC), NADP dependentní malátdehydrogenasy (NADP-ME) a pyruvát, fosfát dikinasy (PPDK) ve čtyřech skupinách rostlin: u tabáku (*Nicotiana tabacum*) SR1 a stejné rostliny s vneseným genem pro potyvirový nestrukturní protein P3 A viru bramboru (PVA), a tabáku *Nicotiana benthamiana* a stejné rostliny s vneseným genem pro HC-Pro protein z PVA. Vlivem infekce Y virem bramboru, kmenem NTN (PVY^{NTN}), se v rostlinách *Nicotiana tabacum* zvyšuje aktivita PEPC, NADP-ME a PPDK. Transgenní rostliny s vneseným genem pro P3 protein se chovají obdobně. Zvýšení aktivity PEPC vlivem virové infekce není provázáno zvýšením mRNA PEPC, a je tedy spíše způsobeno dostupností metabolitů regulujících její aktivitu, popř. změnou fosforylace než syntézou proteinu *de novo*. **B**
- 14 Elicitory neproteinové povahy z kultury houbového patogenu *Leptosphaeria maculans* indukují expresi obranných genů *PR1* a *PR2* v dělohách řepky (*Brassica napus*). Tyto geny se zřejmě podílejí na nespecifické resistenci řepky proti tomuto patogenu. Byly studovány mechanismy polygenně založené resistance *B. napus* proti *L. maculans* a prokázána role H₂O₂ degradujících enzymů (guajakol dependentní peroxidasy a askorbát peroxidasy) a PR-proteinů při vzniku kompatibilní a inkompatibilní interakce. TMV infekce způsobila v chloroplastech susceptibilních rostlin tabáku značný nárůst enzymových aktivit potřebných pro syntézu prekursorů viru, diferenciovaně v thylakoidní a stromální frakci. Pro PVY bylo pozorováno pouze slabé zvýšení těchto enzymů v obou frakcích. **B**
- 15 Difuzní jaderní test, doporučený k rozlišení apoptotického a nekrotického poškození DNA u savčích buněk, jsme aplikovali na jádra z listů a kořenů tabáku (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*). Po aplikaci peroxidu vodíku na jádra z kořenů se průkazně zvýšil průměr jader, způsobený poškozením DNA, po 24 h však bylo poškození DNA kompletně napraveno. To dokazuje, že poškození DNA není podmíněno apoptózou nebo nekrózou, která není reparovatelná, ale reparovatelnou genotoxicitou. Ani po aplikaci DNase-1 a hypertermie nebylo možno rozlišit podle struktury mezi apoptotickou, nekrotickou a genotoxickou fragmentací DNA. **B**
- 16 Pokusy o integraci genetických a fyzických map cizrný dosud narážely na metodické problémy, včetně nemožnosti jednoznačně identifikovat jednotlivé chromozómy. S využitím dříve vypracovaného postupu třídění chromozómů za pomoci průtokové cytometrie byly získány frakce jednotlivých chromozómů. Pomocí PCR s primery pro chromozómově specifické markery pak byly přiřazeny jednotlivé vazebné skupiny ke konkrétním chromozómům. Získané výsledky umožní konstrukci fyzické mapy genomu cizrný a izolaci zemědělsky významných genů. **B**
- 17 Role chloroctových kyselin (CAA) a dalších chlorovaných látek byla studována v jehličí smrku ztepilého. Pomocí ¹⁴C chlorovaných sloučenin bylo zjištěno, že TCA přijímaná kořeny z půdy nepronikne do chloroplastů, zatímco perchlorethylén přijímaný listy do chloroplastů proniká. Tam je oxidován na TCA, a ta

- při svém rozkladu uvolňuje v thylakoidním prostoru vodíkové ionty škodící fotosyntéze. Ve spolupráci s VÚLHM byl proveden monitoring chloridu, AOX (adsorbable organochlorins), a TCA na dvou lokalitách. Výsledky ukazují na přímý účinek vysokých koncentrací chloridu (nad 3 mg/g č. hmot. jehličí) na smrk. Pravděpodobná je chlorace půdní organické hmoty vedoucí ke zvýšení AOX. Hladina TCA v půdě je nízká, zatímco v jehličí je zvýšená. Při chloraci organické hmoty lesní půdy (především ve fermentačním horizontu) vzniká řada organických látek, mezi nimi kyseliny chloroctové DCA a TCA, což bylo opakovaně prokázáno pomocí ³⁶Cl. **B**
- 18 Byly provedeny biochemické analýzy v modelových pokusech s embryogenní buněčnou kulturou *Picea abies* po elicitaci filtrátem izolovaným z media houby *Ascochyta blight*. V průběhu kultivace byly sledovány změny v obsahu sekundárních metabolitů a enzymatických aktivit peroxidáz a β-glykozidázy. Obsah volných a vázaných fenolických látek výrazně vzrostl po 10 h kultivace, což je v souladu s jejich funkcí v obranných reakcích hostitele vůči patogenu. Nárůst obsahu stilbenů, které představují významnou skupinu konstitutivních fungicidních sloučenin v kůře jehličnanů, jsme zaznamenali 10. a 24. h kultivace. Aktivita β-glykozidázy v elicitované embryogenní kultuře se mírně zvyšuje s maximem 24. h elicitace (účast v obranné reakci, syntéza ligninu). Elicitor stimuloval též aktivitu cytoplasmatických peroxidáz a současně se zvýšila též exudace peroxidáz do media. **B**
 - 19 Byly zkonstruovány a funkčně vyzkoušeny expresní vektory pro transientní produkci jednořetězcových monoklonálních protilátek. Úspěšně byly vyzkoušeny systémy agroinfekce a agroinfiltrace. Největší produkce protilátek je v listech druhů rajčete oproti modelovým *N. benthamiana* nebo *N. tabacum*. **B**
 - 20 V Evropské unii bylo přihlášeno k právní ochraně (Community Plant Variety Right) 12 odrůd jabloně s genetickou rezistencí *V_f* ke strupovitosti. Z toho je 8 odrůd kompaktního, sloupcovitého růstu z mutace McIntosh Wijcik. Na 2 odrůdy byl udělen v USA rostlinný patent. Pokračovalo licenční množení odrůd ÚEB, zejména v Evropské unii. Licenční smlouvy na nové odrůdy byly uzavřeny s firmami v ČR (4), Holandsku (3), Itálii (1), Německu (1), Rakousku (2), a Slovensku (2). Opční smlouvy na novošlechtění byly uzavřeny v Itálii (2) a v Německu (1). **C**
 - 21 Byly připraveny a předány pracovní postupy syntézy trans-(Z)-zeatinu. Byla syntetizována řada (10) 2,4,6-trisubstituovaných purinových derivátů, potenciálních antileishmanik. Pro studium nových inhibitorů CDK byla připravena série (8 sloučenin) 2,6,9-trisubstituovaných purinů a jejich syntéza byla z chemického hlediska optimalizována. Bylo připraveno 8 nových derivátů 3,5,7-trisubstituovaných pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů, u nichž byla sledována schopnost inhibice CDK1/cyklin B, a také cytotoxická aktivita vůči nádorovým liniím K-562 a MCF7. Nové deriváty 3,5,7-trisubstituovaných pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů byly téměř vždy silnějšími inhibitory CDK a měly vyšší antiproliferační aktivitu než deriváty purinové. Při těchto syntézách byl objeven nový kondenzovaný pentacyklický heterocyclus, který lze díky nižší aromatickosti kondenzovaného systému dále použít k transformaci na cílové pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny. Byla syntetizována gramová množství aminoroskovitinu pro preklinické studie. **C**
 - 22 Dva promotory identifikované pomocí transkriptomických analýz byly potvrzeny jako specificky aktivní v mikrosporách a buňkách tapeta. Oba promotory byly úspěšně použity pro komplementaci mutant s narušeným průběhem cytokineze. **B**
 - 23 Zkoumali jsme změny v produkci etylénu a oxidu dusnatého v metabolismu reaktivních forem dusíku, tj. tvorbu nitrotyrosinu v proteinech při stárnutí listů u transgenních tabáků se sníženou nebo zvýšenou hladinou cytokininů. Produkce NO klesala v senescentních listech. Nízká hladina cytokininů byla spojena se zvýšeným vývojem NO. Rozdíly mezi hladinami ethylenu i NO byly větší mezi použitými kontrolními kultivary než v průběhu stárnutí listu. Přítomnost nitrotyrosinu v proteinech se zdá lepším indikátorem hladiny reaktivních forem dusíku. Pomocí monoklonálních protilátek jsme zjistili, že membránové proteiny obsahují několikanásobně více nitrotyrosinu ve srovnání s rozpustnými proteiny. **B**
 - 24 Připravili jsme první specifické protilátky proti aromatickým cytokininům, které byly užity k imunoextrakci cytokininů z různých materiálů. Pomocí HPLC/MS byla imunoextrakce využitelná nejen při metabolických a farmakokinetických studiích, ale i při identifikaci a kvantifikaci nových rostlinných cytokininů. **B**
 - 25 V listech tabáku pěstovaných na dlouhém dni byl diurnální průběh hladin cytokininů, auxinu a kyseliny abscisové korelován s aktivitou cytokinin oxidázy/dehydrogenázy. Hlavní vrchol fyziologicky aktivních cytokininů i celkových cytokininů (zejména N-glukosidů a derivátů cis-zeatinu), i auxinu se objevily po polovině světelné periody a byly následovány vrcholem ABA. Volná ABA začala též narůstat po přechodu světlo/tma a dosáhla svého maxima po 3 h tmy. **B**
 - 26 Charakterizace trans-zeatin glukosyltransferázy a cis-zeatin glukosyltransferázy ukázala, že oba enzymy jsou schopné specificky interagovat i s aromatickými cytokininy (*m*-topolinem a *o*-topolinem). Substrátová specifita enzymů je v dobré korelaci se specifitou cytokininových receptorů. **B**
 - 27 Byla zavedena jednoduchá metoda identifikace nových hybridů jabloní homozygotních v genu *V_f* pro rezistenci ke strupovitosti. K tomuto účelu se využívá PCR primerů, které jsou homologní s co-dominantním markerem genu *V_f*. První pár PCR primerů amplifikuje 466 bp dlouhý úsek dominantní alely a 724 bp dlouhý úsek recesivní alely. Celkem bylo testováno 205 nových hybridů, z nichž 133 bylo *V_f* heterozygotních, 27 homozygotně recesivních a 44 homozygotně dominantních. **B**
 - 28 Ve spolupráci s Oregon State University a Iowa State University jsme přinesli první genetický důkaz, že podjednotka exocystu Sec8 se v rostlinách podílí na regulaci polárního růstu. Homozygotní rostliny se

- ztrátovou mutací v tomto lokusu nelze získat, protože pyl nesoucí tuto mutaci neklíčí. **B**
- 29 Ve spolupráci s University of Durham, UK jsme funkčně charakterizovali dva příbuzné formyny třídy I (4 a 8), dokázali, že regulují polymeraci aktinu v závislosti na profilinu, přednostně se polarizovaně lokalizují do plasmalemy, a jejich narušená exprese ústí do aberací v polarizovaném růstu kořenového vlášení. **B**
- 30 Studie genové exprese pomocí kvantitativní RT PCR u transgenního tabáku, nesoucího gen ZOG (pro zeatin O glukosyltransferázu) pod konstitutivním promotorem S35 nebo senescenčním promotorem SAG, v průběhu stresu suchem monitorovala hladiny mRNA na úrovni jednotlivých listů. Prokázala závislost exprese genu pro prolin dehydrogenázu na stáří listu a úrovni stresu. Dále našla souvislost exprese genu *CRK1* (receptorové kinázy, regulované cytokininy) s úrovní exprese ZOG a obsahem cytokininů. **B**
- 31 Studie exprese několika mitochondriálních genů pomocí neradioaktivní Northern hybridizace objevila rozdíly ve velikosti mRNA mezi samičími a hermafroditickými květy *Silene vulgaris*. **B**
- 32 Toxické působení hlinitých iontů na buňky BY-2 tabáku vyvolalo pokles hladiny diacylglycerolu (DAG) a dalšího, zatím dále neidentifikovaného lipidu. Tento pokles je přímo úměrný době (2 - 6 h) a koncentraci (10 - 100 μM) působícího AlCl_3 . Taxol, látka stabilizující mikrotubuly, zvyšuje hladinu diacylglycerolu a působí tak proti působení Al^{3+} . D609, inhibitor fostatidylcholin specifické fosfolipasy C (20 μM) neměl na hladinu DAG vliv. Výsledky ukazují na vzájemnou interakci fosfolipidového signálního systému, cytoskeletu a iontů hlinitých během jejich toxického působení na rostlinné buňky. **B**

c) nejvýznamnější popularizační aktivity pracoviště

Den otevřených dveří (10. listopadu 2005) na pracovišti Lysolaje a Olomouc (celkem asi 120 návštěvníků). Zahájení oficiální spolupráce ÚEB s Prvním obnoveným reálným gymnáziem v Praze, řada studentů nyní pracuje v ÚEB v rámci projektu Otevřená věda. Populárně vědecké články v časopisech (Živa, Vesmír) a denním tisku (MFD, LN). Příspěvky pro Český rozhlas (Radiožurnál, Praha, Leonardo).

d) domácí a zahraniční ocenění zaměstnanců pracoviště:

Na mezinárodní konferenci PhD. studentů v oboru fyziologie rostlin byla udělena cena Doc. Kutáčka Davidu Reňákovi.

e) další specifické informace o pracovišti, o změnách v jeho struktuře a vědecké orientaci, o výsledcích atestací a o překážkách a problémech v činnosti pracoviště:

V lednu 2005 byla zřízena nová Laboratoř signálních přenosů, v prosinci 2005 skončila svou činnost Laboratoř genetických manipulací *in vitro*. V roce 2005 proběhly v ÚEB pravidelné atestace, atestováno bylo celkem 29 VŠ pracovníků.

2. VĚDECKÁ A PEDAGOGICKÁ SPOLUPRÁCE PRACOVIŠTĚ S VYSOKÝMI ŠKOLAMI

Jmenovitě zhodnocení všech významných spoluprací pracoviště s tuzemskými vysokými školami:

a) nejvýznamnější vědecké výsledky ústavu vzniklé v další spolupráci s vysokými školami:

Nejvýznamnější výsledky spolupráce s vysokými školami jsou uvedeny v části 1b pod čísly 1, 2, 6, 7, 11, 13, 14, 17, 21, 23, 24, 29, 32.

b) nejvýznamnější výsledky činnosti výzkumných center a dalších společných pracovišť ústavu s vysokými školami:

Nejvýznamnějším výsledkem činnosti Centra cílených terapeutik, IM 4635608802 za rok 2005 bylo zavedení produkce různých forem jednořetězcové protilátky MEM97 dvěma transienčními produkčními systémy (v části 1b výsledek č. 19).

Nejdůležitější výsledky společného pracoviště ÚEB a University Palackého v Olomouci jsou uvedeny v části 1b pod čísly 2, 21, 24.

c) informace o spolupráci s VŠ na uskutečňování doktorských studijních programů (DSP) a magisterského a bakalářského studia:

Pracovníci ÚEB jako školitelé vedli v roce 2005 39 diplomových a 69 doktorských prací. 4 doktorandi úspěšně obhájili, 13 nových bylo do DSP přijato.

ÚEB má společnou akreditaci (1 a 3) či smlouvu (2) o uskutečňování DSP:

1) s PřFUK Praha pro studijní program BIOLOGIE: studijní obory: Molekulární a buněčná biologie, Genetika a virologie, Fyziologie a anatomie rostlin, 2) s VŠCHT v Praze pro studijní program BIOCHEMIE A BIOTECHNOLOGIE: studijní obor Biotechnologie, a studijní program CHEMIE: studijní obor Biochemie, 3) s PřFUP Olomouc pro doktorský studijní program BIOLOGIE: studijní obor Botanika. Mimo to ÚEB spolupracuje s AF ČZU v Praze.

3. SPOLUPRÁCE PRACOVIŠTĚ S DALŠÍMI INSTITUCEMI A S PODNIKATELSKOU SFÉROU

Zhodnocení spolupráce s dalšími mimovysokoškolskými výzkumnými a mimoakademickými pracovišti:

a) společné projekty výzkumu a vývoje podpořené z veřejných prostředků:

V roce 2005 bylo řešeno celkem 17 projektů (seznam uveden v příloze 1). Nejvýznamnější výsledky jsou shrnuty v části 1b pod čísly 3, 7, 20, 21.

b) výsledky výzkumu a vývoje pro ekonomickou sféru na základě hospodářských smluv:

Výzkum se v roce 2005 opíral o několik desítek uzavřených hospodářských smluv (převážná část z nich se týká šlechtění jabloní). Za nejvýznamnější aktivity v této oblasti považujeme šlechtění jabloní (výsledek č. 20 v části 1b), produkci inhibitorů CDK a syntézu radioaktivně značených látek (výsledek č. 21 v části 1b) a vydávání vědeckých časopisů *Biologia Plantarum* a *Photosynthetica* (příloha 2).

Další hospodářské smlouvy o vědecké spolupráci a společné komercializaci vědeckých výsledků jsou uzavřeny se subjekty Olchemim s.r.o., Quinta-Analytica s.r.o., Cyclacel Ltd., Senetek Ltd. USA, AgroSlužby, s.r.o.

c) nové firmy, které vznikly na základě výsledků činnosti ústavu v oblasti aplikovaného výzkumu:

Žádné.

d) odborné expertizy zpracované v písemné formě pro státní orgány a instituce:

Několik desítek posudků návrhů projektů pro GAČR, GA AV ČR, MŠMT, GAUK, NAZV, Agenturu na podporu vedy SK1, *Grantová agentura SAV 1*, GA MŠ SR, NATO Science Fellowships Programme, posudky pro MŽP, AVIS, USDA USA. Více než 150 oponentních posudků publikací v časopisech domácích i zahraničních (hlavně *Biol. Plant.*, *Photosynthetica*, *Plant Production*, *Physiol. Plant.*, *J. Plant Growth. Regul.*, *Plant Sci.*, *Mikrobiologia*, *Agr. Ecosyst. Environm.*, *J. of Phytopathol.* a další). Oponentní posudky bakalářských, diplomových, doktorských a habilitačních prací, dílčích i závěrečných zpráv nejrozličnějších projektů.

4. MEZINÁRODNÍ VĚDECKÁ SPOLUPRÁCE PRACOVISŤ

Informace o významných mezinárodních vědeckých spolupracích pracoviště:

a) přehled mezinárodních projektů, které pracoviště řeší v rámci mezinárodních vědeckých programů:

Seznam je uveden v příloze 3.

b) nejvýznamnější vědecké výsledky dosažené v rámci mezinárodní spolupráce:

Nejvýznamnější výsledky jsou shrnuty v části 1b pod čísly 1, 2, 3, 4, 11, 13, 15, 16, 17, 21, 26, 28, 29, 31.

c) akce s mezinárodní účastí, které pracoviště organizovalo nebo v nich vystupovalo jako spoluorganizátor:

ÚEB byl hlavním pořadatelem International Symposium Auxins and Cytokinins in Plant Development, červenec 2005, Praha, ČR. Počet registrovaných účastníků 180, z toho 125 zahraničních (z 28 zemí). Dále ÚEB pořádal konferenci Analytická cytometrie III, Červenohorské sedlo 21. – 25. 6. 2005. (180 účastníků, z toho 7 zvaných plenárních řečníků ze zahraničí).

d) výčet jmen nejvýznamnějších zahraničních vědců, kteří navštívili pracoviště AV ČR:

Výčet jmen významných hostů, kteří navštívili naše pracoviště, je uveden v příloze 4.

e) počet fungujících meziústavních dvoustranných dohod:

Žádné.

VÝROČNÍ ZPRÁVA ÚEB AV ČR ZA ROK 2005

text vlastní zprávy (body 1- 4)

Přílohy:

A. přílohy k textu zprávy

- 1) příloha 1 k bodu 3a (výčet řešených projektů ve spolupráci s mimoakademickými mimoškolskými výzkumnými subjekty)
- 2) příloha 2 k bodu 3 b (vydávané vědecké časopisy)
- 3) příloha 3 k bodu 4a (projekty se zahraničními partnery)
- 4) příloha 4 k bodu 4d (seznam vědeckých návštěv v roce 2005)

B. kvantitativní údaje o pracovišti

- 1) 2A (vědečtí pracovníci)
- 2) 2B (údaje o mezinárodní vědecké spolupráci)
- 3) 2C (přehled o počtech vynálezů, patentů...)

C. text tří anotací

- 1) Zažímalová
- 2) Strnad
- 3) Doležel

V Praze dne 16. ledna 2005

RNDr. Ivana Macháčková, CSc.
ředitelka ÚEB AV ČR

RNDr. Radomíra Vaňková, CSc.
předsedkyně VR ÚEB AV ČR

PŘÍLOHA 1 k Výroční zprávě ÚEB AV ČR za rok 2005:**Seznam projektů řešených ve spolupráci s mimoakademickými mimovysokoškolskými partnery:**

<i>poskytovatel</i>	<i>číslo</i>	<i>par</i>	<i>název</i>	<i>řešitel (spoluřešitel)</i>
Grantová agentura AV ČR	IBS5038352	VÚB Havlíčkův Brod	Vitalita sadbových brambor ve vztahu k agroekologickým faktorům a obsahu endogenních hormonů	Macháčková Ivana
Grantová agentura AV ČR	S5038104	Šlechtitelská stanice Hladké Životice	Molekulárně cytogenetické a cytometrické metody pro šlechtění trav a jetelů	Vagera Jiří
Grantová agentura ČR	GA521/03/0113	Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž	Studium přenosu, stabilizace a exprese translokací 1R.1D 5+10 u tritikale ve vztahu k prolaminovým bílkovinám a kvalitě zrna	Vagera Jiří
Grantová agentura ČR	GA206/05/0894	Photon System Instruments	Přístrojová a metodická základna pro ovlivnění a sledování biologických regulací vyšších rostlin, řas a sinic	Strnad Miroslav
Grantová agentura ČR	GA521/05/0257	VÚRV Praha Ruzyně	Genetická, fyziologická a molekulární analýza nového genu pro dobu kvetení u pšenice	Doležel Jaroslav
Grantová agentura ČR	GA522/04/1329	VÚB Havlíčkův Brod	Molekulárně biologická charakterizace, detekce a funkční analýza mop-top viru bramboru (PMTV)	Filigarová Marie
Grantová agentura ČR	GA206/04/0999	VÚLHM Strnady	Studium obranných mechanismů smrku ztepilého na napadení houbovými patogeny (<i>Ascochyta blight</i> , <i>Sirococcus strobilinus</i> , <i>Phoma</i> sp. aj.)	Cvikrová Milena
Grantová agentura ČR	GD521/05/H013	Selgen, a.s.	Pšenice - od genomu ke kvalitě produkce	Doležel Jaroslav
Grantová agentura ČR	GA526/05/0636	VÚLHM Strnady	Úloha chloru při rozkladu organické hmoty v lesním ekosystému jako sinku uhlíku	Matucha Miroslav
Grantová agentura ČR	GA521/03/1380	Sativa Keřkov, a.s., VÚB Havlíčkův Brod	Dva způsoby vedoucí ke snížení obsahu redukujících cukrů ve skladovaných bramborových hlízách	Navrátil Oldřich
Grantová agentura ČR	GA521/03/0113	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.	Studium přenosu, stabilizace a exprese translokací 1R.1D 5+10 u tritikale ve vztahu k prolaminovým bílkovinám a kvalitě zrna	Ohnoutková Ludmila
MŠMT	1M0505	Ústav jaderného výzkumu Řež a.s.	Centrum cílených terapeutik	Angelis Karel
MZ ČR	QF4176	VÚRV Ruzyně	Omezení negativního vlivu abiotických stresů na příjem a využití živin obilovinami	Motyka Václav
MZ ČR	QF4133	Sativa Keřkov, a.s., Selekt Pacov, a.s., Vesa Velhartice, a.s. VÚB Havlíčkův Brod	Tvorba výchozích šlechtitelských materiálů s geny horizontální rezistence k plísni bramborové	Vagera Jiří
MZ ČR	QC 1336	Chmelařský institut s.r.o., VÚRV	Vývoj nových metod pro monitorování diverzity a hodnocení genových zdrojů a zhodnocení jejich potenciálu	Doležel Jaroslav
MZ ČR	QE 1093	ZVÚ KROMĚŘÍŽ, s.r.o., VÚPS, Obchodní sladovny a.s.	Studium a tvorba nových genotypů dvouřadého ozimého sladovnického ječmene pro potřeby sladovnického průmyslu klasickými a biotechnologickými metodami	Ohnoutková Ludmila
MZ ČR	QE 1174	VÚB Havlíčkův Brod, Solana, VÚRV Praha, VÚZT	Rozhodovací systémy pro optimalizaci produkce a kvality konzumních brambor a pro jejich uplatnění na trhu	Macháčková Ivana

PŘÍLOHA 2 k Výroční zprávě ÚEB za rok 2005:

Ediční činnost

Biologia Plantarum

Mezinárodní časopis, který publikuje původní články, přehledné články, krátká sdělení a recenze knih spadajících do všech odvětví experimentální botaniky od molekulární biologie, biotechnologie až po vztahy rostlina – prostředí. Časopis je vydáván ÚEB. Editorem je RNDr. Jiří Čatský, CSc., výkonným editorem RNDr. Jana Pospíšilová, CSc. Časopis je šířen vydavatelem a nakladatelstvím Kluwer Academic Publisher Group, Dordrecht, Nizozemí. Časopis vychází čtvrtletně, články jsou psány v angličtině. Bližší informace a obsah jsou k dispozici na adrese: www.ueb.cas.cz/bp/bp.htm .

Photosynthetica

Mezinárodní časopis zaměřený na výzkum fotosyntézy, který publikuje přehledné články, původní články, krátká sdělení z oboru biofyzika, biochemie, fyziologie a ekologie fotosyntézy. Obsahuje i recenze knih, bibliografie přehledných článků a metodologických prací všech oblastí rostlinné fyziologie. Photosynthetica je nejstarší časopis specializovaný na fotosyntézu. Časopis je vydáván ÚEB. Editorem je RNDr. Zdeněk Šesták, DrSc. Časopis je šířen vydavatelem a nakladatelstvím Kluwer Academic Publisher Group, Dordrecht, Nizozemí. Časopis vychází čtvrtletně, články jsou psány v angličtině. Bližší informace a obsah jsou k dispozici na adrese: www.ueb.cas.cz/ps/ps.htm .

ROK	Impakt faktor	
	<i>Biologia Plantarum</i>	<i>Photosynthetica</i>
1995	0.30	0.52
1996	0.41	0.66
1997	0.39	0.94
1998	0.57	0.66
1999	0.41	0.73
2000	0.42	0.48
2001	0.43	0.81
2002	0.58	0.77
2003	0.92	0.66
2004	0.74	0.73

Photosynthesis Bibliography

Bibliografie zahrnuje práce ze všech oblastí fotosyntézy – od studií na modelových biochemických a biofyzikálních systémech fotosyntetických mechanismů až po primární produkci studovanou metodami růstové analýzy. Každý svazek obsahuje 4000 – 5000 citací, a rejstříky autorů, předmětů a vědeckých názvů rostlin. V každém pátém svazku je kumulativní rejstřík. Editory jsou RNDr. Zdeněk Šesták, DrSc. a RNDr. Jiří Čatský, CSc.

PŘÍLOHA 3 k Výroční zprávě ÚEB za rok 2005:

Pracovníci ÚEB v roce 2005 řešili následující mezinárodní projekty:

<i>program a číslo projektu</i>	<i>název projektu</i>
KONTAKT, MD_45_2	Studium signálních přenosů u rostlin při elicitaci abiotického a biotického stresu
KONTAKT, 1P05ME825	Studium signálních přenosů u rostlin při elicitaci abiotického a biotického stresu
INTAS, Projekt 03-51-5908	The genomic structural organization and physical mapping of the terminal regions of individual rye chromosomes
IAEA, Projekt 12230	Development of Physical Cytogenetic Maps for Bananas and Plantains
Generation Challenge Programme Projekt INIB 2005/42	Targeted Musa genome sequencing and frame map construction
GSF	Untersuchen zum Verhalten von Chloressigsäuren im System Jungfichte/Boden
Royal Society Joint Project, 2004/R3-EU	
Volkswagen Stiftung, I/76 865	Cytokinins: plant hormones and their analogues as antimitotic and anticancer compounds.
Integrated Project EU	Protein Kinases - Novel Drug Targets of Post Genomic Area
Společný projekt AV ČR a CNRS	Study of activity of anion channels in tomato mutants affected in responsiveness to blue light.
Česko-Americká mezinárodní vědeckotechnická spolupráce	Interaction between auxin and light signaling in seedling growth and development of leaf angle in corn.“;
Research and Training Network TIPNET, EU-HPRN-CT-2002- 00265	
FP6, STREP	Targeted gene integration in plants: Vectors, mechanisms and application for protein production.
IP, 603467	Protein Kinases - Novel Target of Post Genomic Area

PŘÍLOHA 4 k Výroční zprávě ÚEB za rok 2005:

Jména významných zahraničních hostů, kteří navštívili v roce 2005 ÚEB:

Prof. Susan Lambert	Tasmanian Inst. of Agricultural Research	Austrálie
Prof. H. Van Onckelen	University of Antwerp	Belgie
Dr.L. Meijer	CNRS, Station Biologique	Francie
Prof. G.Epritikhine	Univ. of Paris VII and CNRS, Gif-sur-Yvette	Francie
Prof. Dr. A. Mukherjee	University of Calcutta	Indie
Prof. Roni Aloni	Tel Aviv University	Izrael
Prof. Hitoshi Sakakibara	RIKEN, Yokohama	Japonsko
Prof. Takashi R. Endo	Kyoto University, Kyoto	Japonsko
Prof. J. Van Staden	Univ. of Kwazulu-Natal, Pietermaritzburg	JAR
Dr. Annette Nassuth	University of Guelph, Guelph, Ontario	Kanada
Prof. Vipen K. Sawhney	University of Saskatchewan, Saskatoon	Kanada
Dr. Jozsef Fodor	Plant Protection Institute HAS, Budapest	Maďarsko
Prof. Vince Ördög	West Hungarian Univ.	Maďarsko
Dr. Frantisek Baluška	University of Bonn	Německo
Prof. Dieter Volkmann	Univerzity of Bonn	Německo
Prof. Dr. P. Schroder	GSF Neuherberk	Německo
Prof. Jiří Friml	ZMBP, University Tübingen	Německo
Prof. R. Hertel	Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg	Německo
Prof. Thomas Schmülling	Free University of Berlin	Německo
Prof. Krystyna Janas	University of Lodz	Polsko
Dr. Pierre Lagoda	Joint FAO/IAEA Division, Vienna	Rakousko
Prof. Heribert Hirt	University of Vienna	Rakousko
Prof. Irene Lichtscheidl	University of Vienna	Rakousko
Prof. M.-T. Hauser	Agricultural University Vienna	Rakousko
Dr. Alexander Vershinin	Inst. of Cytology and Genetics, Novosibirsk	Rusko
Prof. Zdeno Šubr	SAV Bratislava	Slovensko
Dr. D. Bastviken,	University of Linköping	Švédsko
Prof. Goran Sandberg	Umeå Plant Science Center	Švédsko
Dr. Faik Ahmet Ayaz	Karadeniz Technical Univ. Trabzon	Turecko
Dr. Forrest G. Chumley	Kansas State University, Manhattan	USA
Prof. A. Theologis	Plant Gene Expression Center, Albany	USA
Prof. Angus Murphy	Purdue University, West Lafayette	USA
Prof. Bonnie Bartel	Rice University, Houston	USA
Prof. David Mok	Oregon State University, Corvallis	USA
Prof. David W. Galbraith	University of Arizona, Tucson	USA
Prof. Joseph Kieber	University of North Carolina, Chapel Hill	USA
Prof. Machteld Mok	Oregon State University, Corvallis	USA
Prof. Mark Estelle	Indiana University, Bloomington	USA
Prof. Tom Guilfoyle	University of Missouri, Columbia	USA
Prof. David Twell	University of Leicester	Velká Británie
Prof. John W. Snape	John Innes Centre, Norwich	Velká Británie
Prof. Malcolm Bennett	University of Nottingham, Sutton Bonington	Velká Británie
Prof. Ottoline Leyser	University of York	Velká Británie
Prof. Richard Napier	HRI/University of Warwick	Velká Británie

ANOTACE 1:

AUXINY INHIBUJÍ ENDOCYTOSU U ROSTLIN A STIMULUJÍ SVŮJ VLASTNÍ TRANSPORT Z BUNĚK

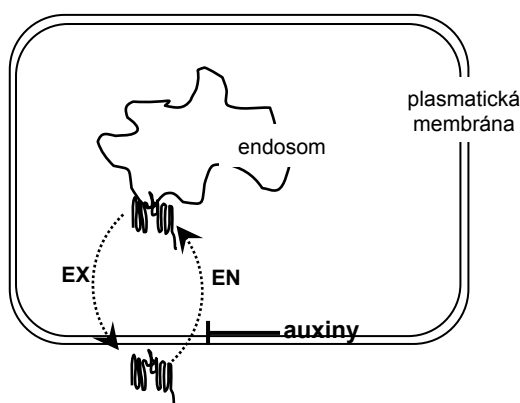
Eva Zažímalová a kolektiv

Jedním z mechanismů, kterým signální molekuly (tj. hormony a růstové regulátory) mohou regulovat životní procesy buňky, je kontrola vnitrobuněčného transportu některých proteinů na místo jejich určení. Tento způsob regulace je u živočišných buněk často založen na působení na specializovaný transport proteinů membránovými váčky, tzv. konstitutivní cyklování. Konstitutivní cyklování sestává ze dvou opakujících se kroků: z přenosu proteinů z plasmatické membrány dovnitř do buňky (endocytosa) a z jejich transportu zpět na plasmatickou membránu (exocytosa). I když některé proteiny u rostlin konstitutivně cyklují, nebyl zde dosud žádný obdobný mechanismus působení rostlinných hormonů nebo růstových regulátorů prokázán.

Tato práce ukazuje, že auxiny, jedny z hlavních regulátorů vývoje rostlin, inhibují endocytosu. Tento účinek je specifický pro biologicky aktivní auxiny a není závislý na expresi genů ani na aktivitě proteosyntézy.

Auxiny inhibují endocytosu několika typů proteinů. Mezi ně patří i proteiny rodiny PIN, tj. regulátory přenosu auxinů z buňky. Po inhibici endocytosy se zvyšuje výskyt těchto proteinů na plasmatické membráně a tím se zvětšuje kapacita přenosu molekul auxinů z buňky. Takto mohou auxiny podporovat svůj vlastní export z buněk. Biologický význam inhibice endocytosy auxiny a regulace jejich vlastního exportu z buněk byl prokázán např. během gravitropní odezvy (tj. reakce rostlinných orgánů na změnu směru působení gravitace), kdy dochází k asymetrické translokaci auxinů. V kořeni *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že tato asymetrická translokace auxinů koreluje s různou mírou endocytosy proteinů PIN.

Tato pozorování odrážejí dosud nepopsaný mechanismus působení rostlinných hormonů: auxiny inhibují endocytosu, čímž mimo jiné regulují i vnitrobuněčný transport proteinů PIN a tím jejich výskyt a aktivitu na buněčném povrchu. Tímto způsobem mohou auxiny zpětně regulovat svůj vlastní transport.



Obr. Schéma inhibice endocytosy auxiny

EX = exocytosa

EN = endocytosa

= proteiny PIN

= inhibice

Paciorek T, Zažímalová E, Ruthardt N, Petrášek J, Stierhof Y-D, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jürgens G, Geldner N, Friml J: Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435: 1251-1256, 2005.

Ve spolupráci s laboratoří Dr. Jiřího Frimla (ZMBP, University of Tübingen, Tübingen, Germany)

ANNOTATION 1:

AUXINS INHIBIT ENDOCYTOSIS IN PLANTS AND STIMULATE THEIR OWN TRANSPORT FROM CELLS

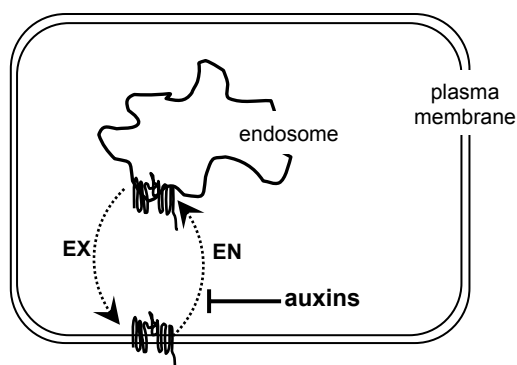
Eva Zažímalová *et al.*

Regulation of intracellular traffic of some proteins to their proper position within a cell is one of the mechanisms for signalling compounds (hormones and growth regulators) to control physiological processes in cells. In animal cells this way of regulation is often based on the control of a specialised intracellular transport of proteins in membrane vesicles, so-called constitutive cycling. The process of constitutive cycling consists of two repeated, consecutive steps: translocation of proteins from plasma membrane into cell (endocytosis) and their transport back to the plasma membrane (exocytosis). Even if some proteins in plants exhibit constitutive cycling, no such effect(s) of any plant hormone and/or growth regulator on intracellular traffic of proteins has been observed so far.

This work demonstrates that auxins, major regulators of plant growth and development, can inhibit endocytosis. This effect is specific for biologically active auxins and it is independent of gene expression and proteosynthesis.

Auxins inhibit endocytosis of several plasma membrane proteins, including PINs - regulators of auxin efflux from cells. Once endocytosis is inhibited, the incidence of PINs on the plasma membrane increases and, consequently, the capacity for efflux of auxins is higher. In this way auxins can stimulate their own efflux from cells. Biological significance of inhibition of endocytosis by auxins and of regulation of their own efflux from cells was proved during gravitropism (i.e. the reaction of plant organs to the change of direction of gravity stimulus), which is connected with the asymmetric auxin distribution. In *Arabidopsis thaliana* roots the asymmetric auxin distribution correlates with intensity of endocytosis of PIN proteins.

These observations reflect a novel mechanism of action of plant hormones: auxins inhibit endocytosis and thus control, among other things, the intracellular trafficking of PIN proteins and concomitantly their abundance and activity on the cell surface; in this way auxins regulate their own cell-to-cell transport.



Obr. Scheme of inhibition of endocytosis by auxins

EX = exocytosis

EN = endocytosis

 = PIN proteins

 = inhibition

Paciorek T, Zažímalová E, Ruthardt N, Petrášek J, Stierhof Y-D, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jürgens G, Geldner N, Friml J: Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435: 1251-1256, 2005

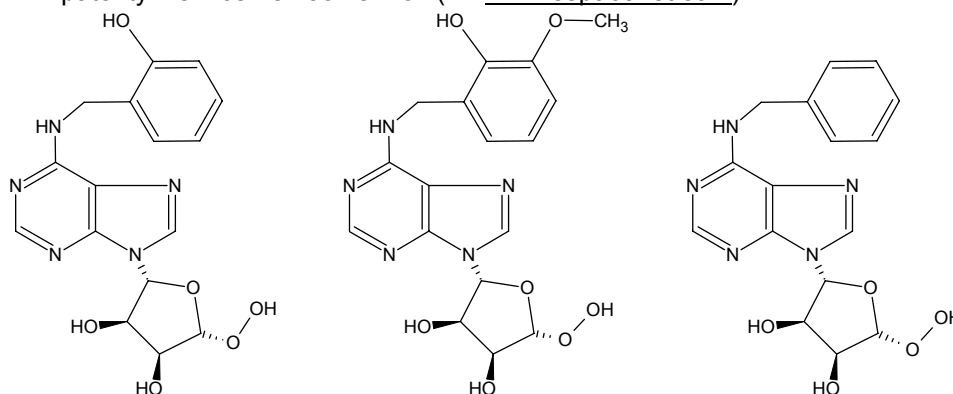
In collaboration with the laboratory of Dr. Jiří Friml (ZMBP, University of Tübingen, Tübingen, Germany)

ANOTACE 2:

NOVÉ CYTOKININY S VÝZNAMNÝMI BIOLOGICKÝMI VLASTNOSTMI

Miroslav Strnad a kol.

Cytokininy jsou růstové regulátory na bázi N⁶-substituovaných derivátů adeninu, které vykazují řadu významných biologických aktivit v rostlinách (působí proti stárnutí, urychlují buněčné dělení). Před 10 lety se nám podařilo nalézt látky s vysokou cytokininovou aktivitou, které jsme podle rostlinného objektu, z kterého byly izolovány, nazvali topoliny. To nás vedlo k přípravě řady nových derivátů topolinů a jejich ribosidů, které byly testovány v několika biologických testech. Nejaktivnější ve zpomalení stárnutí se ukázaly být methoxytopoliny (Doležal *et al.*, 2006), u nichž se nám podařilo prokázat i jejich přirozený výskyt (Tarkovská *et al.*, 2003). Některé ribosidy vykazovaly překvapivě i protinádorové účinky. Za nejúčinnější lze považovat 2-hydroxy-3-methoxybenzyladenosin (WO03040144), který vykazuje až 50-krát vyšší *in vivo* protinádorové účinky než olomoucín a rovněž než řada známých protinádorových léčiv. Připravili jsme i orálně dostupnou formu a vyvinuli citlivou metodu stanovení této látky v krvi, založenou na imunoafinitní chromatografii s využitím monoklonálních protilátek proti aromatickým cytokininům kombinované s kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (Hauserová *et al.*, 2005). Výše uvedené látky jsou chráněny mezinárodními patenty ve více než 50 zemích (viz www.espacenet.com).



Obr. 1: Struktury aromatických cytokininů – ortho-topolin ribosid, 2-hydro-3-methoxybenzyladenosin a benzyladenosin.

Tarkovská D, Doležal K, Tarkowski P, Astot C, Holub J, Fuksová K, Schmulling T, Sandberg G, Strnad M: Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol Plant* 117. 579-590, 2003.

Doležal K, Popa I, Zatloukal M, Lenobel R, Hradecká D, Vojtěšek B, Uldrijan S, Mlejnek P, Werbrouck S, Strnad M: Substitution derivatives of N⁶-benzyladenosine, methods of their preparation, their use for preparation of drugs and cosmetics. Patent No. EP1575973, 21.9. 2005

Doležal K, Popa I, Holub J, Lenobel R, Werbrouck S, Strnad M, Zatloukal M: Heterocyclic compound based on N⁶-substituted adenine, methods, of their preparation, their use for preparation of drugs, cosmetic preparations and growth regulators, pharmaceutical preparations, cosmetic preparations and growth regulators containing these compounds. Patent No. **US2005043328**, 24.2. 2005.

Hauserová E, Swaczynová J, Doležal K, Lenobel R, Popa I, Hajdúch M, Vydra D, Fuksová K, Strnad M: Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *J. Chromatogr. A* 1100(1):116-125, 2005.

Doležal K, Popa I, Kryštof V, Spíchal L, Fojtíková M, Holub J, Lenobel R, Schmulling T, Strnad M: Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorg Med. Chem.* 14(3): 875-884, 2006.

ANNOTATION 2:

NEW CYTOKININS WITH SIGNIFICANT BIOLOGICAL ACTIVITIES

Miroslav Strnad *et al.*

Cytokinins are growth regulators which can be defined as N⁶-substituted adenine derivatives which slow down ageing (senescence) and induce cell division. Ten years ago we isolated and identified a new group of aromatic cytokinins called topolins (isolated from poplar – the Czech word is *topol*). The discovery led us to development of new, highly active topolin analogues. Among them, methoxytopolins were recognised as compounds with the highest antisenescent activity (Doležal *et al.*, 2006). They were also identified as naturally occurring substances in many different plant species (Tarkovská *et al.*, 2003). On the other hand, ribosides of topolins strongly inhibited proliferation of many different cancer cells, being 50-times more effective than olomoucine, roscovitine and many other anticancer drugs. 2-Hydroxy-3-methoxybenzyladenosine (WO03040144) has been shown to be the most effective one (IC 50 around 0.1 μM). Orally available form of this compound was prepared as well as a new immunoaffinity chromatography – liquid chromatography - mass spectrometric detection based method was developed for its determination in blood (Hauserová *et al.*, 2005). Topolin analogues and their ribosides are under patent protection in more than 50 countries (see www.espacenet.com).

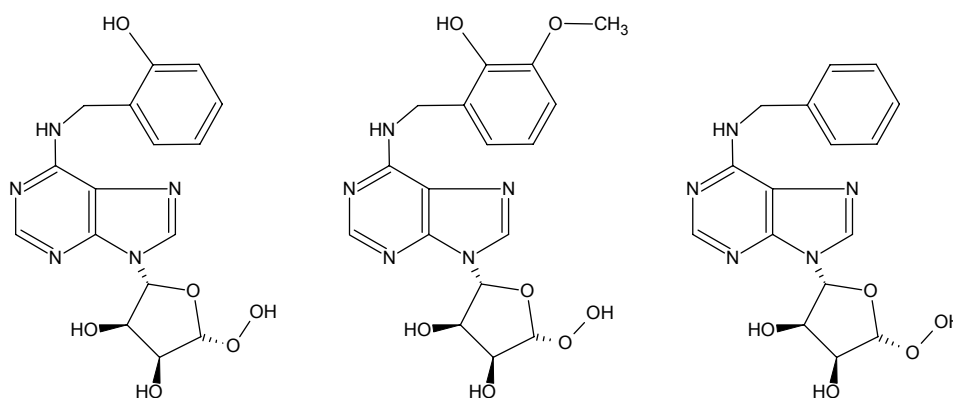


Fig. 1: Structures of aromatic cytokinins – *ortho*-topolin riboside, 2-hydro-3-methoxybenzyladenosine a benzyladenosine.

Tarkovská D, Doležal K, Tarkowski P, Astot C, Holub J, Fuksová K, Schmulling T, Sandberg G, Strnad M: Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol Plant* 117. 579-590, 2003.

Doležal K, Popa I, Zatloukal M, Lenobel R, Hradecká D, Vojtěšek B, Uldrijan S, Mlejnek P, Werbrouck S, Strnad M: Substitution derivatives of N⁶-benzyladenosine, methods of their preparation, their use for preparation of drugs and cosmetics. Patent No. EP1575973, 21.9. 2005

Doležal K, Popa I, Holub J, Lenobel R, Werbrouck S, Strnad M, Zatloukal M: Heterocyclic compound based on N⁶-substituted adenine, methods, of their preparation, their use for preparation of drugs, cosmetic preparations and growth regulators, pharmaceutical preparations, cosmetic preparations and growth regulators containing these compounds. Patent No. **US2005043328**, 24.2. 2005.

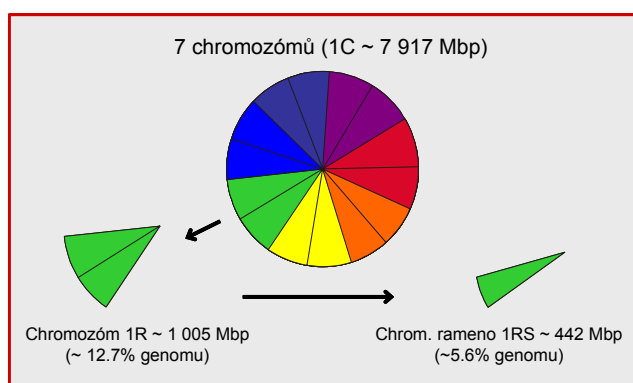
Hauserová E, Swaczynová J, Doležal K, Lenobel R, Popa I, Hajdúch M, Vydra D, Fuksová K, Strnad M: Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins *J. Chromatogr. A* 1100(1): 116-125, 2005.

Doležal K, Popa I, Kryštof V, Spíchal L, Fojtíková M, Holub J, Lenobel R, Schmulling T, Strnad M: Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorg Med. Chem.* 14(3): 875-884, 2006.

UNIKÁTNÍ MATERIÁL PRO GENOMIKU ŽITA A PŠENICE

Jaroslav Doležel a kolektiv

Genomika je věda zabývající se analýzou genomů živých organismů, tedy studiem jejich dědičné informace. Většina této dědičné informace je u rostlin i živočichů uložena v buněčném jádře ve formě chromozómů. Množství jaderné DNA, ve které je dědičná informace zapsána, neodpovídá složitosti organismu. Genomy řady rostlinných druhů svou velikostí několikanásobně převyšují velikost genomu člověka. Zatímco ten je představován asi třemi miliardami párů bází, genom žita má velikost přibližně osm miliard a pšenice dokonce sedmáct miliard párů bází DNA. Analýza takto velkých genomů je nesmírně obtížná a nákladná.



Obr. Rozdělení genomu žita na jednotlivé chromozómy a jejich ramena. Krátké rameno chromozómu 1R představuje pouze 5,6% z celkové velikosti genomu žita.

Může být však výrazně zjednodušena rozdělením genomu na jednotlivé chromozómy, případně jejich části (viz obr.). S tímto cílem byla na našem pracovišti vyvinuta metoda, která za použití průtokového cytometru umožňuje třídít jednotlivé typy chromozómů, případně jejich ramena. DNA tříděných chromozómů není poškozená a je vhodná pro konstrukci knihoven DNA klonovaných ve vektoru BAC. Tyto knihovny jsou tvořeny souborem poměrně velkých fragmentů DNA (kolem 100 000 párů bází), které reprezentují celý genom a jsou klíčovým materiálem pro sekvenování a izolaci genů. V předchozích letech jsme vyvinuli tři

takovéto knihovny specifické pro jednotlivé chromozómy pšenice nebo jejich rameno*. V roce 2005 jsme na našem pracovišti zkonstruovali knihovnu další, specifickou pro krátké rameno chromozómu 1 žita. Tím byla potvrzena vhodnost námi vyvinuté strategie pro různé rostlinné druhy. Protože tato část genomu žita se díky šlechtění dostala do genomu řady odrůd pšenice, představuje naše knihovna jedinečný materiál také pro genomiku této plodiny. V současné době je knihovna pro krátké rameno chromozómu 1 žita využívána ve spolupráci s několika zahraničními pracovišti pro analýzy genomů pšenice a žita, studium evoluce těchto genomů a pro izolace zemědělsky významných genů.

Kubaláková M, Valárik M, Bartoš J, Vrána J, Číhalíková J, Molnár-Láng M, Doležel J: Analysis and sorting of rye (*Secale cereale* L.) chromosomes using flow cytometry. *Genome* 46: 893-905, 2003.

Šafář J, Bartoš J, Janda J, Bellec A, Kubaláková M, Valárik M, Pateyron S, Weiserová J, Tušková R, Číhalíková J, Vrána J, Šimková H, Faivre-Rampant P, Sourdille P, Caboche M, Bernard M, Doležel J, Chalhoub B: Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *Plant J.* 39: 960-968, 2004.

Doležel J, Kubaláková M, Bartoš J, Macas J: Chromosome flow sorting and physical mapping. - In: Meksem, K., Kahl, G. (eds.): *The Handbook of Plant Genome Mapping. Genetic and Physical Mapping.* Pp. 151-171. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.

*Spolupráce s Dr. B. Chalhoubem (*Unité de Recherches en Génomique Végétale, Évry, France*)

UNIQUE RESOURCE FOR GENOMICS OF RYE AND WHEAT

Jaroslav Doležel *et al.*

Genomics is concerned with genome analysis of living organisms, studying their heritable information. Majority of this information in plants and animals is located in the cell nucleus in the form of chromosomes. The amount of nuclear DNA bearing this information does not correlate with organism complexity. Genome sizes of many plant species exceed that of human several times. Whereas in human one complete copy of this information is made up of about 3 billion DNA base pairs, the genome of rye comprises about 8 billion and the genome of bread wheat even 17 billion base pairs. Analysis of such huge genomes is extremely difficult and expensive.

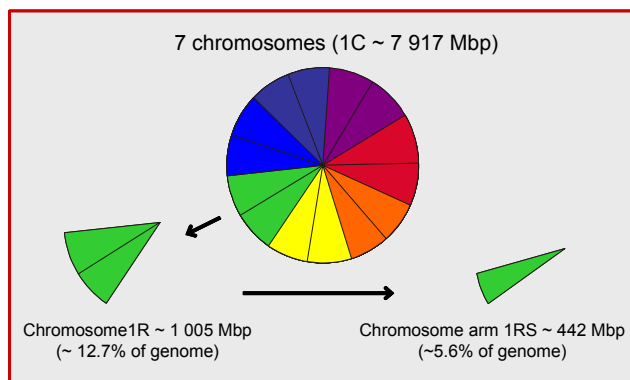


Fig. Dissection of the rye genome into individual chromosomes and their arms. The short arm of 1R chromosome comprises only 5.6% of the whole genome.

However, it can be markedly simplified by dissecting the genome into individual chromosomes or their parts (Fig.). With this aim, we have developed an original method based on the use of flow-cytometer for sorting of individual chromosomes and chromosome arms. DNA of flow-sorted chromosomes proved to be intact and thus suitable for construction of BAC DNA libraries. These libraries consist of a set of relatively large DNA fragments (about 100 thousand base pairs) that represent the whole genome. They are a crucial resource for genome sequencing and gene isolation. Previously we constructed three BAC libraries specific for wheat chromosomes

or a chromosome arm*. In 2005, a BAC library specific for the short arm of rye chromosome 1R was constructed in our laboratory. This achievement approved the suitability of our strategy for various plant species. As the 1RS chromosome arm became a part of many wheat cultivars (conferring important agronomic traits to wheat) this library poses a unique genomic tool also for this crop. At present the library is used in cooperation with several abroad laboratories for genome analyses in rye and wheat, evolution studies and for isolation of agriculturally important genes.

Kubaláková M, Valárik M, Bartoš J, Vrána J, Čihalíková J, Molnár-Láng M, Doležel J: Analysis and sorting of rye (*Secale cereale* L.) chromosomes using flow cytometry. *Genome* 46: 893-905, 2003.

Šafář J, Bartoš J, Janda J, Bellec A, Kubaláková M, Valárik M, Pateyron S, Weiserová J, Tušková R, Čihalíková J, Vrána J, Šimková H, Faivre-Rampant P, Sourdille P, Caboche M, Bernard M, Doležel J, Chalhoub B: Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *Plant J.* 39: 960-968, 2004.

Doležel J, Kubaláková M, Bartoš J, Macas J: Chromosome flow sorting and physical mapping. - In: Meksem, K., Kahl, G. (eds.): *The Handbook of Plant Genome Mapping. Genetic and Physical Mapping.* Pp. 151-171. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.

*Cooperation with Dr. B. Chalhoub (*Unité de Recherches en Génomique Végétale, Évry, France*).