

# Studie proveditelnosti

pro projekty předkládané v rámci Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání,  
prioritní osa 1, investiční priorita 1, specifický cíl 1,  
výzva: **Excelentní výzkum**

1. Základní údaje .....	3
2. Stručný popis projektu - abstrakt .....	3
3. Profil žadatele a partnerů VaV centra.....	4
3.1. Stručná charakteristika žadatele projektu.....	4
3.2. Stručná charakteristika partnerů projektu .....	5
3.3. Charakteristika VaV centra/center vstupujících do projektu .....	7
3.4. Stávající výzkumné aktivity VaV centra/center související s aktivitami projektu .....	14
3.5. Propojení výzkumu, vývoje a vzdělávání .....	17
4. Celkové cíle projektového záměru.....	19
5. Výzkumné programy, rozvoj internacionalizace, tým, infrastrukturní vybavení .....	20
5.1. Výzkumný program 1: Funkční mikroskopie rostlinných biomembrán a povrchů .....	20
5.1.1. Vazba na výzkumné programy centra, rozvoj centra.....	20
5.1.2. Současný stav poznání .....	21
5.1.3. Výzkumné cíle, aktivity a výsledky.....	23
5.1.4. Mezinárodní spolupráce.....	40
5.1.5. Výzkumný tým .....	41
5.1.6. Charakteristika pořizovaného klíčového vybavení/funkčních modulů.....	48
5.1.7. Vazba výzkumného programu na rozpočet projektu .....	50
5.2. Výzkumný program 2: Dynamika nano- a mikročásticových systémů v živých buňkách .....	51
5.2.1. Vazba na výzkumné programy centra, rozvoj centra.....	51
5.2.2. Současný stav poznání .....	52
5.2.3. Výzkumné cíle, aktivity a výsledky.....	55
5.2.4. Mezinárodní spolupráce.....	63
5.2.5. Výzkumný tým .....	64
5.2.6. Charakteristika pořizovaného klíčového vybavení/funkčních modelů.....	74
5.2.7. Vazba výzkumného programu na rozpočet projektu .....	79
5.3. Výzkumný program 3: Nové metody a zařízení pro vysokorozlišovací mikroskopii a chemickou analýzu nativních biologických vzorků .....	80
5.3.1. Vazba na výzkumné programy centra, rozvoj centra.....	80
5.3.2. Současný stav poznání .....	81
5.3.3. Výzkumné cíle, aktivity a výsledky.....	88
5.3.4. Mezinárodní spolupráce.....	98
5.3.5. Výzkumný tým .....	99



5.3.6. Charakteristika pořizovaného klíčového vybavení/funkčních modelů .....	109
5.3.7. Vazba výzkumného programu na rozpočet projektu .....	111
<b>6. Využití infrastruktury.....</b>	<b>111</b>
6.1. Využití existující infrastruktury .....	111
6.2. Potřebnost a využití nové infrastruktury a vybavení.....	115
<b>7. Administrace a Řízení projektu.....</b>	<b>119</b>
7.1. Analýza rizik.....	119
7.1.1. Analýza rizik - aktivity a, d, e, f .....	119
7.1.2. Analýza rizik – aktivita b .....	122
<b>8. Rozpočet.....</b>	<b>124</b>
8.1. Zajištění spolufinancování v realizační fázi.....	124
<b>9. Udržitelnost .....</b>	<b>124</b>
9.1. Udržitelnost aktivit a, d, e, f .....	124
9.2. Udržitelnost aktivity b .....	127
9.3. Plán vývoje výsledků a výstupů projektu v době udržitelnosti.....	127
<b>10.Přílohy .....</b>	<b>129</b>

## 1. ZÁKLADNÍ ÚDAJE

Položka	
Název projektu	Pokročilé zobrazovací a analytické metody pro studium dynamiky buněčných dějů
Název žadatele	Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.
Hlavní a vedlejší obor projektu dle Stromu odborností a oborů OP VVV	1AB5 Biovědy 1AB3 Chemie

## 2. STRUČNÝ POPIS PROJEKTU - ABSTRAKT

Rychlý technologický pokrok poslední doby umožnil nashromáždit velké množství informací o složení živých organismů. Tyto jsou tvořeny dobře fungující směsí nízkomolekulárních látek, biopolymerů a lipidů. Sekvenční a strukturní informace však sami o sobě nestačí k pochopení mechanismů, které zajišťují činnost rostlinných i živočišných organismů. Proto je důležité studovat vztahy mezi jednotlivými složkami živé hmoty a tyto vztahy i prostorově lokalizovat. V současné době jsou pro tyto účely využívány metody optické, elektronové a magnetické rezonanční mikroskopie. Velkou výhodou optické fluorescenční mikroskopie využívající specifické fluorescenční značky je možnost studovat buněčné procesy v nativních podmínkách. Prostorové rozlišení a hloubka ostrosti optické mikroskopie jsou však omezeny. Vyššího prostorového rozlišení lze naopak dosáhnout metodami klasické elektronové mikroskopie, která ovšem není využitelná pro studium nefixovaných nativních, vlhkých nebo živých vzorků. Zobrazení magnetickou rezonancí má sice nižší rozlišení než optická či elektronová mikroskopie, ale umožňuje na nativních biologických subjektech zobrazit biologické děje na funkční úrovni.

Cílem předkládaného projektu je pomocí podstatného vylepšení zobrazovacích metod a zejména environmentální elektronové mikroskopie posunout hranice poznání v oblasti *in vivo* a dynamických *in situ* studií biologických vzorků, včetně možnosti specifického imunologického označení buněčných struktur využívající syntetické nanočástice. Nové technologie a postupy budou cíleně testovány VaV centrem hlavního navrhovatele (ÚEB AV ČR) při studiu extracelulárního prostoru a povrchů rostlinných buněk a jejich signálních a transportních systémů na plazmatické membráně a v endomembránovém systému. Současně v oblasti studia živočišných buněk budou nové postupy a technologie využity na studium sledování a analýzy jaderné architektury, regulaci genové exprese a transportu makromolekul mezi jádrem a cytoplazmou (IKEM). Zapojená partnerská VaV centra reprezentují špičkový vědecký výzkum, v rámci projektu se vhodně doplňují a tvoří mezioborový vědecky excelentní celek. Mají dlouhodobé zkušenosti v přípravě specifických sond pro mikroskopickou detekci a jejich testování v podmínkách *in vitro* na simplifikovaných lipozómových systémech (ÚMCH AV ČR), implementaci pokročilých postupů fixace a zobrazení rostlinných a živočišných buněk (ÚEB AV ČR, IKEM) a výzkumu a vývoji nových fyzikálních metod a technologií pro elektronovou mikroskopii (ÚPT AV ČR).

Pochopení dynamiky dějů na biomembránách na ultrastrukturální úrovni je klíčové jak pro základní, tak aplikovaný výzkum. Ve všech třech výzkumných programech tak projekt obsahuje řadu využití mikroskopických postupů pro cílenou přípravu a následnou detekci nanočástic využívaných v medicíně a zemědělství. Za hlavní lze považovat optimalizaci transportu biologicky aktivních substancí po cílovém organismu při potlačení vedlejších účinků v medicíně

a zvýšení efektivity chemické ochrany rostlin v zemědělství minimalizací ekologické zátěže. Velmi slibnou oblastí využití je v textilním průmyslu využitelná cílená modifikace složení buněčných stěn rostlin bez nutnosti použít genové modifikace.

### 3. PROFIL ŽADATELE A PARTNERŮ VAV CENTRA

#### 3.1. Stručná charakteristika žadatele projektu

Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky, v. v. i. (ÚEB AVČR), IČ 61389030, je právnickou osobou zřízenou na dobu neurčitou se sídlem Rozvojová 263, 165 02 Praha 6. Zřizovatelem ÚEB AVČR je Akademie věd České republiky - organizační složka státu. Orgány ÚEB AVČR jsou ředitel RNDr. Martin Vágr, CSc., rada pracoviště a dozorní rada. Ředitel je statutárním orgánem a je oprávněn jednat jménem ÚEB AVČR.

ÚEB AVČR byl založen v roce 1962. V současnosti má 14 laboratoří, které se nacházejí v Praze a Olomouci. Hlavní činností je především základní výzkum v oblasti rostlinné experimentální biologie zahrnující buněčnou biologii, genetiku, fyziologii, fytopatologii a biotechnologie. Je též aktivní v aplikovaném výzkumu. Nosnými tématy výzkumu jsou studium mechanismů účinku rostlinných hormonů a jejich spolupráce při přenosu signálu z prostředí, funkční genomika, molekulární mechanismy regulace růstu a vývoje a patofyziologie rostlin. V oboru biotechnologií se ústav zabývá především navrhováním a přípravou požitelných vakcín z rostlin a mechanismy fyto-remediace. Aplikace molekulárně biologických postupů ve šlechtění jabloní umožnila ÚEB AVČR vytvořit řadu úspěšných odrůd jabloní odolných proti houbovým chorobám. Studium rostlinných hormonů též vedlo k syntéze látek zpomalujících stárnutí kůže nebo vykazujících slibné cytostatické efekty. Podrobné informace o výzkumné činnosti ÚEB AVČR prováděné v letech 2010-2014 lze nalézt v informační brožuře na tomto odkazu: [http://www.ueb.cas.cz/cs/system/files/users/public/ueb\\_scirep\\_2010-2014\\_small.pdf](http://www.ueb.cas.cz/cs/system/files/users/public/ueb_scirep_2010-2014_small.pdf).

Ústav disponuje špičkovým instrumentálním vybavením v oblasti pokročilé chemické analýzy růstových regulátorů, genetické analýzy pro mapování komplexních genomů, ale v posledním desetiletí úspěšně rozvíjí i techniky pokročilé mikroskopické analýzy, které jsou rozhodující pro navrhované centrum excelentního výzkumu.

V letech 2014-2015 publikovali pracovníci ÚEB AVČR vedle vědeckých monografií a kapitol ve vědeckých monografiích celkem 277 prací v odborných impaktovaných časopisech, včetně nejprestižnějších multioborových časopisů Nature, Science a PNAS. Více než čtvrtina prací byla otištěna v časopisech patřících dle impaktního faktoru do nejlepšího decilu daného oboru, více než polovina pak v časopisech nejlepšího kvintilu. Pouze méně než 15% článků bylo publikováno v časopisech s impaktním faktorem pod mediánem oboru. Velká většina prací vznikla ve spolupráci se zahraničními pracovišti, z velké většiny v renomovaných vědeckých institucích. Vedle velké řady neformálních spoluprací byly tyto spolupráce v letech 2014-2015 podloženy společnými projekty se zahraničními pracovišti, které zahrnovaly 7. rámcový program EU (2 projekty) a program COST (20 projektů). Vysoká kvalita výzkumných pracovníků ÚEB AV ČR se projevuje i v množství jejich přednášek na mezinárodních konferencích (132 v letech 2014-2015) a jejich členstvím v redakčních radách prestižních odborných časopisů (37 v roce 2015) a mezinárodních vědeckých vládních i nevládních organizací. Výjimečné postavení ÚEB AV ČR v oblasti hormonálních regulací na celosvětové úrovni lze dokumentovat i pravidelnou organizací prestižního setkání odborníků v tomto oboru s názvem ACPD (Auxiny a cytokiny ve vývoji rostlin, Auxins and Cytokinins in Plant Development). Poslední ročník

proběhl v roce 2014, další je v plánu v roce 2018 (<http://acpd.cas.cz/>). V letech 2014-2015 bylo též v ÚEB AV ČR předneseno cca 100 přednášek zahraničních vědců. Pracovníci ústavu vypracovali v letech 2014-2015 více než 700 odborných expertíz pro tuzemské zahraniční organizace zahrnující posudky grantových návrhů pro GA ČR, TAČR, GAUK, MZe, MŠMT, DFG (SRN), FWO (Belgie), ERC (EU), NSF (USA), BARD (Izrael) a dále cca 250 recenzí rukopisů do mezinárodního odborného tisku. Pracovníci a studenti působící v ÚEB získali v posledních dvou letech řadu významných tuzemských i mezinárodních ocenění, jejich seznam lze dohledat ve výročních zprávách na odkazu <http://www.ueb.cas.cz/cs/category/internet-site/ustav/vyrocní-zpravy>. ÚEB AVČR též dlouhodobě vydává dva odborné časopisy, *Biologia Plantarum* (ISI IF<sub>2015</sub> 1,665) a *Photosynthetica* (ISI IF<sub>2015</sub> 1,558).

Informační zdroje o ÚEB AVČR, organizační schéma instituce, složení dozorčí rady a rady instituce jsou dostupné na webových stránkách <http://www.ueb.cas.cz/>. Finanční podíl navrhovatele ÚEB AVČR v navrhovaném projektu je: 79 493 730,40,- Kč.

### 3.2. Stručná charakteristika partnerů projektu

#### ***Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.***

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i. (ÚMCH AVČR), IČ 61389013, je právnickou osobou zřízenou na dobu neurčitou se sídlem v Praze 6, Heyrovského náměstí 2, PSČ 162 06. Zřizovatelem ÚMCH AVČR je Akademie věd České republiky – organizační složka státu. Orgány ÚMCH AVČR jsou ředitel Ing. Jiří Kotek, Dr., rada pracoviště a dozorčí rada. Ředitel je statutárním orgánem a je oprávněn jednat jménem ÚMCH AVČR.

ÚMCH AVČR představuje největší výzkumnou kapacitu v oblasti výzkumu polymerů a polymerních materiálů v České republice. V dané oblasti se řadí i mezi nejvýznamnější centra akademického (základního) výzkumu nejen v České republice, ale i ve světě. ÚMCH disponuje znalostním potenciálem více než stovky vědeckých pracovníků, jak v klíčových oborech makromolekulární chemie, fyzikální chemie a fyziky polymerů, tak v oborech přesahujících do oblasti medicíny, farmacie a biotechnologií, zejména v oblasti vývoje nových polymerů pro lékařské a farmaceutické použití a zkoumání základních principů interakcí syntetických polymerů s organismy. Mezi vědeckými pracovníky ústavu lze jmenovat několik desítek vědců, kteří jsou uznávanými osobnostmi ve svých oborech ve světě.

Již od svého založení na konci 50. let minulého století je Ústav makromolekulární chemie v povědomí domácí i světové odborné veřejnosti spojen s výzkumem polymerů pro medicínu. Zakladatel ústavu, prof. Otto Wichterle, vynálezce polymerního materiálu a technologie pro výrobu měkkých kontaktních čoček, jednoho z nejvýznamnějších českých vynálezů, rozšířeného a uznávaného celým světem. I v současnosti je program výzkumu polymerů pro medicínu jedním ze stěžejních výzkumných směrů ÚMCH.

Přínos ÚMCH pro výzkum a vývoj polymerů pro farmaceutické a lékařské aplikace, konkrétně v oblasti nových polymerních forem léčiv a polymerů pro regenerační medicínu dokládají i prestižní ocenění Česká hlava, která získali vědci z ÚMCH v minulých letech (Národní cena 2002, Cena Invence 2005, 2008). V roce 2008 byl ústav vyhodnocen cenou „Českých 100 nejlepších“ v oborové kategorii „Vzdělání-věda-zdraví-humanita“ jako jediný zástupce z ústavů Akademie věd.

Informační zdroje o ÚMCH AVČR jsou dostupné na webových stránkách <http://www.imc.cas.cz/>. Finanční podíl partnera ÚMCH AVČR v navrhovaném projektu je 59 974 292,20,- Kč.

### ***Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)***

IKEM je největším a nejlepším specializovaným klinickým pracovištěm v České republice. Jedná se o příspěvkovou organizaci přímo řízenou Ministerstvem zdravotnictví ČR a tvoří ho 4 specializovaná centra (Kardiocentrum, Transplantcentrum, Centrum diabetologie, Centrum experimentální medicíny), komplement výše uvedených center, 8 klinik, 15 odborných pracovišť, základen a laboratoří a přes 1 800 pracovníků.

IKEM se zabývá zejména problematikou kardiovaskulárních chorob, transplantací orgánů, diabetologií a poruchami metabolismu. Mezi jeho hlavní funkce, kromě specializované klinické činnosti ve vybraných oblastech, patří také vědeckovýzkumná činnost v oblasti zdravotnictví, výchova vědeckých pracovníků a účast na výchově a doškolování lékařů.

Vědeckovýzkumnou činností se IKEM snaží řešit zdravotnický a společensky nejzávažnější problémy. K výzkumným úkolům využívá mnoho oborový týmový přístup a nejmodernější technické vybavení. Dlouhodobě spolupracuje se širokým spektrem zdravotnických pracovišť doma i ve světě. Doba a charakter výzkumu se liší dle jeho zaměření. Obecně je v IKEM prováděn krátkodobý i dlouhodobý výzkum s charakterem převážně základního a aplikovaného průmyslového lékařského výzkumu.

V období let 2014-2015 bylo v IKEM nepřetržitě řešeno 68 výzkumných projektů financovaných z prostředků ministerstva zdravotnictví ČR, grantové agentury ČR, MŠMT ČR, ministerstva vnitra ČR, technologické agentury ČR a Ministerstva průmyslu a obchodu ČR. 7 projektů financovala Evropská komise prostřednictvím 7. Rámcového programu EU. V období let 2014-2015 bylo nepřetržitě též řešeno 27 dílčích projektů financovaných institucionální podporou.

Informační zdroje o IKEM jsou dostupné na webových stránkách IKEM <http://www2.ikem.cz/>. Finanční podíl partnera IKEM v projektu je: 59 917 050,08,- Kč

### ***Ústav přístrojové techniky AV ČR, v. v. i.***

Ústav přístrojové techniky Akademie věd České republiky, v. v. i. (ÚPT AVČR), IČ 680811731, je právnickou osobou zřízenou na dobu neurčitou se sídlem v Brně, Královopolská 62/147, PSČ 612 64. Zřizovatelem ÚPT je Akademie věd České republiky – organizační složka státu. Orgány ÚPT jsou ředitelka Ing. Ilona Müllerová, DrSc., rada pracoviště a dozorčí rada. Ředitelka je statutárním orgánem a je oprávněna jednat jménem ÚPT.

ÚPT byl založen roku 1957 jako instituce zajišťující přístrojová vybavení pro další ústavy Akademie věd v oblastech elektronové mikroskopie, magnetické rezonance a později laserů. Po roce 1989 dochází k procesu transformace a na ÚPT jsou ponechány pouze nejperspektivnější oblasti bádání. Struktura vědeckých oddělení a výzkumných skupin je nastavena tak, aby vycházela z badatelského zaměření projektů, jež jsou na ÚPT řešeny. Na ÚPT dochází k propojení teoretického, experimentálního a aplikovaného výzkumu, do něhož jsou zapojena vědecká oddělení ústavu; Speciální technologie, Elektronová mikroskopie, Magnetická rezonance a Kryogenika, Medicínské signály, Optické mikromanipulační techniky a Koherenční optika. Od roku 2013 jsou součástí ÚPT Aplikační laboratoře pokročilých mikrotechnologií a nanotechnologií (ALISI) vzniklé za podpory projektu VaVpl. Svou činností ÚPT přispívá ke zvyšování úrovně poznání a vzdělanosti a k využití výsledků vědeckého výzkumu v praxi. Ve spolupráci s VŠ uskutečňuje doktorské studijní programy, a tím přispívá k výchově mladých vědeckých pracovníků.

Informační zdroje o ÚPT AVČR jsou dostupné na webových stránkách <http://www.isibrno.cz> a <http://alisi.isibrno.cz>. Finanční podíl partnera ÚPT AVČR v navrhovaném projektu je: 79 834 636,- Kč.

### 3.3. Charakteristika VaV centra/center vstupujících do projektu

#### Výchozí stav:

Navrhovaný projekt bude realizován VaV centry třech ústavů AV ČR, tj. ÚEB (navrhovatel), ÚMCH a ÚPT a centrem IKEM MZ ČR. Jasně definovaná a z hlediska aktuální tematiky projektu optimálně se doplňující vědecká témata jsou na špičkové úrovni v centrech řešena desítky let. Všechna centra vstupující do projektu programově realizují výzkum a vývoj a všechna jsou buď přímo akreditována (IKEM) či jsou aktivní v akreditových programech bakalářského, magisterského a doktorského vysokoškolského vzdělávání především na Univerzitě Karlově v Praze, ale i dalších vysokých školách. Výzkumná strategie zapojených VaV center dlouhodobě zahrnuje studium buněčných struktur rostlinných (ÚEB AVČR) a živočišných (IKEM) buněk metodami pokročilé fluorescenční, elektronové a magnetické rezonanční mikroskopie. Tyto technologie jsou v mnoha aspektech navázány na chemickou syntézu nanočásticových systémů, které jsou dlouhodobě předmětem studia VaV centra ÚMCH AVČR. Výzkumná strategie VaV centra ÚPT AVČR zahrnuje především vývoj nových instrumentálních technik v oblasti environmentální elektronové mikroskopie. Propojením popsanych strategií plánujeme vytvořit centrum excelentního výzkumu, jehož hlavním cílem bude prostřednictvím zásadního vylepšení environmentální elektronové mikroskopie posunout hranice poznání v oblasti *in vivo* studií biologických vzorků, včetně označení buněčných struktur pomocí syntetických nanočástic. Tento hlavní cíl je doprovázen řadou menších cílů, které k němu směřují a zahrnují i další mikroskopické metody a techniky přípravy vzorků.

**Navrhovatel ÚEB AVČR** vstupuje do projektu aktivitou **VaV centra orientovaného na pokročilou mikroskopickou analýzu rostlinných buněk**. Toto centrum je tvořeno pracovníky 5 laboratoří a bude pro účely navrhovaného projektu vedeno vedoucím mikroskopického pracoviště ÚEB AVČR RNDr. Janem Petráškem, Ph.D. (<http://www.ueb.cas.cz/if>). Výzkumná strategie laboratoří zapojených do stávajícího VaV centra zahrnuje studium dynamiky cytoskeletu, endomembránového transportu, integrálních a periferních membránových proteinů, membránových lipidů a extracelulárního materiálu. Ve všech těchto oblastech je pracoviště dlouhodobě instrumentálně rozvíjeno s finanční podporou ústavu, akademie věd a řady účelových projektů. Rozvoj pokročilých mikroskopických metod začal v ÚEB v roce 2006, kdy byl v rámci investice centra základního výzkumu MŠMT REMOROST, projekt č. LC 06034 (<http://remorost.ueb.cas.cz/>; 2006-2010) uveden do provozu konfokální laserový skenovací mikroskop Zeiss LSM 5 Duo se spektrální detekcí a rychlým čárovým skenerem. V letech 2006-2010 se podařilo úspěšně zavést a publikovat v podobě původních sdělení vedle metod běžného vícekanálového a spektrálního zobrazování rostlinných preparátů i fotomanipulační experimenty typu FRAP a FRET. Pořízení automatizované stanice pro histochemické metody Intavis InsituPro VSi (Operační program Praha - konkurenceschopnost, projekt CZ.2.16/3.1.00/21159; 2009) umožnilo rozvoj imunofluorescenčních metod. Neinvazivní metody *in vivo* optické fluorescenční mikroskopie se podařilo dále vylepšit v roce 2012 díky úspěchu v soutěži o nákladné přístroje AVČR, kdy byla laboratoř posílena o konfokální mikroskop na principu rotujícího Nipkowova kotouče, Nikon Eclipse Ti-E, Yokogawa CSU-X1. Studium buněčných procesů ve vysokém časovém i prostorovém rozlišení pokračovalo pořízením vysoce citlivého spektrálního laserového konfokálního invertovaného mikroskopu Zeiss LSM 880 (Operační program Praha - konkurenceschopnost, projekt CZ.2.16/3.1.00/21519; 2015). Spolu se vzpřímeným mikroskopem se strukturovaným osvětlením (Zeiss Apotome 2; investice ÚEB AVČR, 2015) je tak nyní jednotka vybavena

špičkově pro *in vivo* fluorescenční mikroskopii. Pracoviště též disponuje transmisním elektronovým mikroskopem, který byl instalován v roce 2012 (Operační program Praha - konkurenceschopnost, projekt CZ.2.16/3.1.00/24014). Mikroskopické pracoviště bylo oficiálně zařazeno jako samostatná jednotka do organizační struktury ÚEB AVČR na konci roku 2015 (<http://www.ueb.cas.cz/if>). Přehled publikací v časopisech vytvořených stávajícím VaV centrem ÚEB zaměřeným na mikroskopické techniky je uveden v příloze 1. Zdůraznit s ohledem na předkládaný projekt je zapotřebí především práce, které přispěly k odhalení mechanismů směřované exocytózy u rostlin, pochopení významu dynamiky membránových přenašečů auxinu ve vývoji rostlin a definování role membránových lipidů pro přenos signálu u rostlin.

**VaV centrum partnerského pracoviště ÚMCH AVČR** je reprezentováno v navrhovaném projektu **oddělením "Nadmolekulárních struktury a samoasociační procesy (SUPRAMOL)"**, vedeného RNDr. Petrem Štěpánkem DrSc. Tento tým se systematicky a dlouhodobě zabývá fyzikálně-chemickým studiem procesů samouspořádání polymerních systémů a jejich aplikací pro řízenou přípravu nanočásticových systémů především pro biomedicínské aplikace. Výzkum členů týmu vedl k podrobnému pochopení rozdílů při vzniku nanočástic na typu změny vnějšího prostředí, především změny teploty, pH, termodynamické kvality rozpouštědla, iontové síly či přítomnosti povrchově aktivní látky. Vysoké kontroly procesu vzniku nanočástic a jejich užitných vlastností bylo dosaženo díky systematickému fyzikálnímu a fyzikálně-chemickému přístupu k procesům fázové separace a následného samouspořádání, včetně studia modelových systémů, což vyžaduje vysokou profesionalitu při používání relevantních experimentálních technik, především statického, dynamického a elektroforetického rozptylu světla, malouhlového rozptylu rentgenových paprsků a neutronů, izotermální titrační kalorimetrie a radionuklidového značení. Tým má rozsáhlé zkušenosti v oblasti polymerů specificky degradovatelnými reaktivními formami kyslíku a polymerních antioxidantů, jak v nanočásticových systémech pro kontrolované uvolňování farmak, tak v antioxidačních gelech pro hojení poranění (přípravek HEMAGEL® byl vyvinut na tomto pracovišti).

Další zdroje informací o pracovišti partnerském VaV centru SUPRAMOL je možné nalézt na odkazu [http://www.imc.cas.cz/cz/umch/c\\_supra.html](http://www.imc.cas.cz/cz/umch/c_supra.html).

**VaV centrum partnerského pracoviště IKEM** vstupuje do projektu zapojením svého pracoviště **radiodiagnostiky a intervenční radiologie (ZRIR)**, které zajišťuje veškerá radiodiagnostická vyšetření pro IKEM a navíc se specializuje na rozvoj a výzkum v oborech intervenční radiologie a magnetické rezonance, ve kterých poskytuje speciální služby pro zdravotnická a vědecko-výzkumná zařízení v ČR.

V rámci ZRIR se navrhovaným projektem bude zabývat především skupina experimentální MR spektroskopie a zobrazování, která má nejdélejší tradici v aplikaci a výzkumu v oboru magnetické rezonance (MR) v České republice. Skupina má k dispozici celotělový 1,5 T MR tomograf pro klinická vyšetřování, celotělový MR tomograf 3 T určený převážně ke klinickému výzkumu v MR spektroskopii a zobrazování umožňující pracovat s  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  jádru a zobrazovat malá zvířata, experimentální 4,7 T MR tomograf, dva relaxometry (velikost pole je 0,5 T a 1 T), optické mikroskopy a fluorescenční optické zařízení pro zobrazování malých zvířat. Tato skupina zajišťuje speciální vyšetření zahrnující zobrazování transplantovaných buněk v klinickém i preklinickém výzkumu a v této oblasti je jednoznačně vedoucím pracovištěm v ČR.



Ve výzkumné MR skupině na ZRIR IKEM pracuje 14 vědeckých pracovníků a Ph.D. studentů. V oblasti klinického výzkumu skupina pracuje na problematice metabolického syndromu a souvisejících otázkách v oblasti diabetu a obezity a kardiovaskulárních onemocnění. Byla vyvinuta řada vyšetřovacích algoritmů pro MR spektroskopii, funkční a kardiologické MR vyšetřování na klinických tomografech. V experimentálním výzkumu se skupina zaměřuje na molekulární zobrazování, včetně testování nových kontrastních látek pro buněčné značení.

Pracovníci ZRIR se aktivně podílejí na řešení výzkumných projektů jednak v rámci individuálních grantů, jednak jako spolupracovníci při řešení výzkumných záměrů ostatních pracovišť IKEM. Pracoviště je intenzivně zapojeno do výzkumu v oblasti buněčného zobrazování, kde spolupracuje s řadou českých i zahraničních pracovišť. Jedním z významných výsledků skupiny a dalších pracovníků IKEM je zobrazení transplantovaných pankreatických ostrůvků značených specifickými kontrastními látkami metodou MR zobrazování na experimentálním modelu i v klinickém experimentu. Tento model transplantace a léčby diabetu je možno považovat za příklad úspěšné teranostiky (metoda využívající zobrazování pro kontrolu léčby). Za významný úspěch je možné považovat také studie značení buněk kostní dřevě (a dalších druhů buněk) nanočásticemi železa a sledování jejich pohybu po transplantaci. Pracoviště prokázalo vhodnost využití komerčních kontrastních látek Resovist a Endorem jako první ve světě, a to nedlouho po instalaci experimentálního MR tomografu v roce 1999. Tyto experimenty se prováděly a provádějí v součinnosti s dalšími pracovišti IKEM a Ústavem experimentální medicíny AV ČR (ÚEM AV ČR).

Pracoviště spolupracuje na výzkumných projektech zejména s Národním ústavem duševního zdraví; Přírodovědeckou fakultou, 1. lékařskou fakultou a Matematicko-fyzikální fakultou Univerzity Karlovy; Ústavem makromolekulární chemie AV ČR, Ústavem organické chemie AV ČR, ÚEM AV ČR a s řadou dalších. Ze zahraničních institucí je velmi dobře rozvinutá spolupráce s Centrem MR excellence LU ve Vídni, Centrem molekulárního a buněčného zobrazování „moSAIC“ v Leuven, Preklinickým MR zobrazovacím centrem, Radboud University Medical Centre (RUNMC), Nijmegen a Univerzitou v Bergenu.

Informační zdroje o ZRIR jsou dostupné na webových stránkách IKEM: <http://www.ikem.cz/cs/komplement/pracoviste-radiodiagnostiky-a-intervencni-radiologie-zrir/a-40/>.

**VaV centrum partnerského pracoviště ÚPT AVČR** vstupuje do projektu prostřednictvím **centra Environmentální elektronové mikroskopie (VaV centrum EEM)**, jejímž základem je vědecká skupina Environmentální elektronová mikroskopie vedená Ing. et Ing. Vilémem Nedělou, Ph.D, doplněná o špičkové vědce z UPT a dalších českých i zahraničních výzkumných institucí. Skupina EEM je pevně zakotvena ve struktuře ÚPT i projektu OP VaVpl s názvem Aplikační a vývojové laboratoře pokročilých mikrotechnologií a nanotechnologií (ALISI). Činnost ÚPT i ALISI jsou finančně zabezpečeny institucionálním příspěvkem od AV ČR, účelovým financováním prostřednictvím tuzemských (např. dvě TAČR Centra kompetence TE01020118, TE01020233, GAČR Centrum excellence GB14-36681G) i zahraničních výzkumných grantů (např. FP7 606988 SIMDALEE2, FP7-PEOPLE 316679 Transact), Národním programem udržitelnosti (LO1212) a částečně i smluvním výzkumem pro řadu partnerů. Základním posláním VaV centra EEM v projektu je propojení teoretického, experimentálního a aplikovaného výzkumu v oblastech elektronové optiky a mikroskopie, koherenční optiky a interferometrie, optických mikromanipulačních technik, technologického využití elektronových a laserových svazků, kryogeniky a supravodivosti. Hlavní úsilí VaV centra EEM v projektu bude směřovat k objevování a rozvíjení nových experimentálních metod studia

vlastností a mikrostruktury převážně živé i neživé hmoty, popř. nových postupů z oblasti špičkových technologií. Další zdroje informací je možné nalézt na odkazech <http://www.isibrno.cz/>, <http://alisi.isibrno.cz/> a <http://eem.isibrno.cz/>.

K průkopníkům environmentální rastrovací elektronové mikroskopie (EREM) v České Republice patřili prof. Rudolf Autrata z Ústavu přístrojové techniky AVČR, v.v.i v Brně. Profesor Autrata byl také autorem řady patentů a článků z oblasti výzkumu a vývoje detekčních systémů pro REM a EREM. Poprvé představil scintilační monokrystalické materiály YAG:Ce<sup>3+</sup> a YAP:Ce<sup>3+</sup> jako základní prvek detektorů signálních elektronů. VaV centrum environmentální elektronové mikroskopie (VaV centrum EEM) vedené bývalým studentem prof. Autraty, Ing. Vilémem Nedělou, Ph.D., v této více než třicetileté tradici výzkumu a vývoje EREM a detekčních systémů pokračuje. Zabývá se aplikovaným, ale zejména základním výzkumem zaměřeným na simulace interakcí elektronů s plynem, vodou a pevnou látkou v EREM, návrhem a vývojem detekčních systémů pracujících na principu nárazové ionizace molekul plynů signálními elektrony, vývojem scintilačně-fotonásobičových detektorů pro detekci sekundárních i zpětně odražených elektronů v prostředí vysokého tlaku plynů. VaV centrum EEM se také dlouhodobě zabývá simulacemi proudění plynů v EREM, konkrétně optimalizacemi designů elektronově optických částí EREM s ohledem na čerpání plynu. Ve spolupráci s řadou akademických partnerů realizuje VaV centrum výzkum širokého spektra obtížně pozorovatelných zejména na radiační poškození citlivých vzorků, často v rámci dynamických in-situ experimentů. Významné aktivity centra jsou také v oblasti výzkumu a vývoje speciálních mikroskopických metod, instrumentace a integrací nových technologií do EREM. VaV centrum EEM je v současnosti jedním z mála center na světě, které řeší problematiku environmentální rastrovací elektronové mikroskopie komplexně.

V roce 2014 uspělo VaV centrum EEM v interní soutěži AVČR na podporu nákupu nákladných přístrojů. Díky této finanční podpoře byl v roce 2015 zakoupen unikátně vybavený vysokorozlišovací elektronový mikroskop QUANTA 650 FEG a svoji činnost započala evropská laboratoř environmentální elektronové mikroskopie (Obr. 3.1). Vedle širokého spektra běžných detekčních systémů je nový mikroskop vybaven na zakázku upravenou komoru vzorku velkých rozměrů, vyhřívaným a chlazeným držákem vzorku (od -20 °C do 1000 °C), systémem dvou přesných mikromanipulátorů s širokým příslušenstvím, např. systémem řízené injekce kapalin a plynů na vzorek a systémem EBIC. Mikroskop také umožňuje provádět energiově disperzní prvkovou X-Ray analýzu elektricky nevodivých vzorků bez nutnosti pokrytí jejich povrchu dalšími vrstvami v prostředí vysokého tlaku plynů a v „deceleration“ modu studium vzorků v podmínkách velmi nízkých energií primárního elektronového svazku. Studium tenkých řezů a nano-částic v kapalinách je možné díky klasickému STEM a speciálnímu wet-STEM módu. Nový mikroskop je skvělým nástrojem pro mezioborovou vědeckou spolupráci a po řadě plánovaných úprav a po doplnění o unikátní systémy vyvinuté na ÚPT AVČR v Brně bude jedinečným zařízením v celosvětovém měřítku. Vybavení VaV centra EEM je vzhledem k tématice projektu na špičkové úrovni.



**Obr. 3.1: Pracoviště EREM Quanta 650 FEG, ÚPT AVČR.**

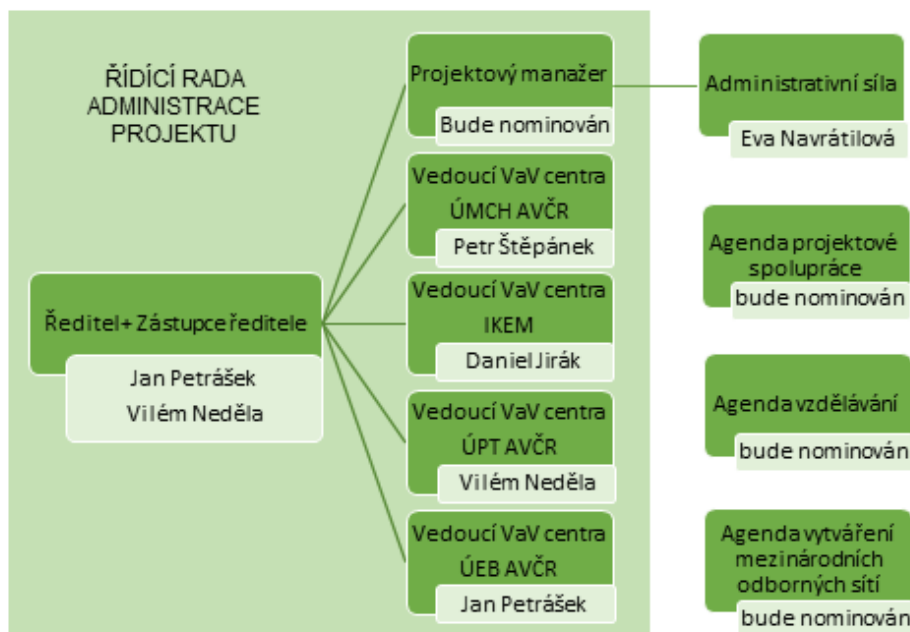
**Plánovaná organizační struktura v době realizace projektu:**

Žadatel i partneři jsou si vědomi, že řídicí a organizační struktura navrhovaného projektu (Obr. 3.2) je s ohledem na rozsáhlost řešené problematiky a počet zapojených pracovníků zásadní a její efektivní nastavení výrazně přispěje k dosažení a naplnění cílů projektu a podstatnou měrou omezí případná rizika spojená s realizací.

Řídicí rada administrace projektu (Obr. 3.3) bude složena z ředitele projektu, který nese celkovou zodpovědnost za projekt (Jan Petrášek, odpovědný řešitel za žadatelské VaV centrum ÚEB AV ČR), zástupce ředitele (Vilém Neděla, odpovědný řešitel za partnera EEM ÚPT AV ČR), vedoucích jednotlivých VaV center, Petr Štěpánek (odpovědný řešitel za partnera SUPRAMOL ÚMCH AV ČR), Daniel Jiráček (odpovědný řešitel za partnera ZRIR IKEM) a projektového manažera (bude nominován).



**Obrázek 3.2: Řídicí a organizační struktura navrhovaného projektu.**



**Obr. 3.3: Řídící rada administrace navrhovaného projektu.**

**Úkolem řídicí rady administrace projektu** bude dohlížet na plnění monitorovacích indikátorů projektu, kontrolovat finanční hospodaření projektu, projednávat a schvalovat změny v rozpočtech projektu týkajících se účastníků projektu, pověřovat ředitele k jednání s MŠMT v případě změnového řízení nebo řešení jiných problémů, průběžně kontrolovat a vyhodnocovat dosažené výsledky, řešit případné konflikty, definovat podmínky výběrových řízení a účastnit se hodnocení nabídek. Rada bude zasedat minimálně čtyřikrát ročně. Zasedání může být též svoláno v případě nutnosti řešení neočekávaných problémů (finanční problémy, personální a administrativní záležitosti). Výsledky jednání Rady budou závazné pro všechny účastníky projektu. V případě řešení konfliktů se Rada bude řídit zněním Smlouvy o partnerství, která je již předběžně schválena navrhovatelem a všemi partnery a připravena k podpisu pro druhé kolo hodnocení. Zápisy z jednání budou přílohami dílčí nebo závěrečné zprávy. Zasedání Rady bude probíhat za osobní účasti všech členů rady.

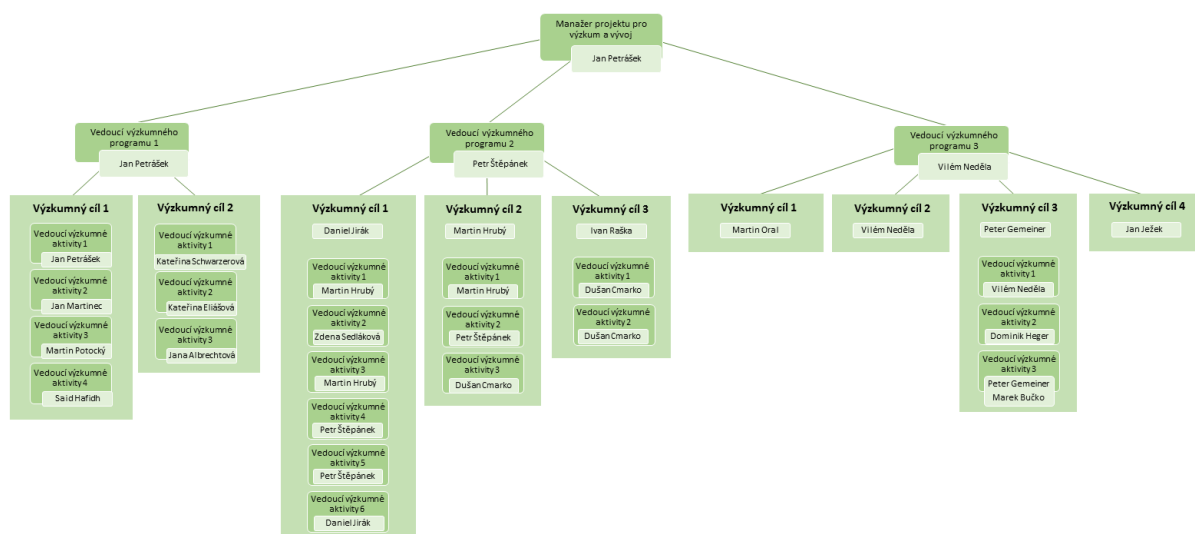
**Ředitel projektu, Jan Petrášek**, bude zodpovědný za úspěšnou realizaci projektu. Jeho funkcí bude řízení projektu jako celku. Bude rozhodovat na základě jednání v řídicí radě administrace projektu o základních tématech projektu a případných změnách a konfliktech, schvalovat rozpočty jednotlivých částí projektu, schvalovat harmonogram jednotlivých částí projektu, schvalovat a potvrzovat dokončení jednotlivých milníků projektu v součinnosti se zástupcem ředitele projektu.

**Zástupce ředitele/odpovědný řešitel za partnera EEM ÚPT, Vilém Neděla**, bude členem řídicí rady administrace projektu a spolu s ředitelem projektu bude odpovědný za úspěšnou realizaci projektu. Zástupce ředitele projektu bude mít pravomoc jmenovat projektového manažera. Jeho zodpovědností bude dále zajistit principy toku informací mezi jednotlivými členy řídicí rady administrace projektu, řídit a usměrňovat a zajistit dodávky od třetích osob. Z hlediska vnitřních vazeb týmu bude odpovědný řediteli projektu a bude mít pravomoc delegovat jednotlivé úkoly na další členy řídicí rady administrace projektu. Z pohledu vnějších vazeb bude mít pravomoc jednat v rámci stanoveného harmonogramu jednotlivých fází projektu a jejich rozpočtu.

**Vedoucí VaV center/odpovědní řešitelé partnerů ÚEB (Jan Petrášek), ÚMCH (Petr Štěpánek), ÚPT (Vilém Neděla) a IKEM (Daniel Jirák)** budou členy řídicí rady administrace projektu. V rámci projektového týmu bude jejich úkolem sledovat a řídit administrativní řízení, a to především na straně partnerů. Jejich zodpovědností bude dále zajistit principy toku informací mezi jednotlivými členy řídicí rady administrace projektu. Z pohledu vnějších vazeb budou mít pravomoc jednat v rámci stanoveného harmonogramu jednotlivých fází projektu a jejich rozpočtu.

**Projektový manažer, bude nominován,** bude členem řídicí rady administrace projektu. Bude zodpovědný za realizační management projektu ve vztahu k poskytovateli dotace a jednotlivým členům projektu. Bude zodpovídat za dodržování podmínek dotačního titulu, případná změnová řízení v rámci projektu, kontrolovat administrativní výstupy projektu a to zejména mzdové podklady. Bude upozorňovat vedoucí VaV center projektu na případné nesrovnalosti ve vztahu k dotačnímu titulu a zároveň fungovat jako zpětná vazba pro tým projektu. Bude zodpovědný za ekonomické posouzení projektu (zajištění podkladů pro posouzení rentability). Bude kontrolovat čerpání projektového rozpočtu. Ve své činnosti bude podřízen zástupci ředitele projektu.

**Řídicí rada projektu pro výzkum a vývoj** (Obr. 3.4) bude složena z manažera projektu pro výzkum a vývoj, který ponese celkovou zodpovědnost za věcnou náplň projektu (Jan Petrášek), vedoucích jednotlivých výzkumných programů projektu (viz kapitola 5), tj. 1. (Jan Petrášek), 2. (Petr Štěpánek) a 3. (Vilém Neděla) a vedoucích výzkumných pracovníků jednotlivých výzkumných programů. Úkolem řídicí rady projektu pro výzkum a vývoj bude dohlížet na plnění střednědobých a krátkodobých realizačních plánů z hlediska vzájemné provázanosti VaV center žadatele a partnerů z hlediska naplnění plánovaných výsledků projektu, průběžně kontrolovat a vyhodnocovat dosažené výsledky projektu a vývoj projektu a kontrolovat naplňování milníků projektu. Rada bude zasedat minimálně čtyřikrát ročně. Zasedání může být též svoláno v případě nutnosti řešení neočekávaných problémů (zpoždění řešení dílčích úkolů, technické problémy). Výsledky jednání rady budou závazné pro všechny účastníky projektu. Zápisy z jednání budou přílohami dílčí nebo závěrečné zprávy. Zasedání rady bude probíhat za osobní účasti všech členů rady.



**Obrázek 3.4. Řídicí rada projektu pro výzkum a vývoj**

**Vedoucí jednotlivých výzkumných programů** budou odpovědní za jednotlivé výzkumné programy a odborné vedení týmů, budou dohlížet na plnění harmonogramu prací a dílčích cílů, evidovat průběžné výsledky, informovat řídicí radu projektu pro výzkum a vývoj o splnění dílčích cílů (k plánovanému datu), identifikovat problémy při řešení věcné náplně projektu s povinností neprodleného informování rady, připravovat materiály pro dílčí a závěrečné zprávy a připravovat situační zprávy o průběhu plnění cílů na vyžádání rady. Vedoucí jednotlivých výzkumných programů podle potřeby budou organizovat na pracovištích porady, kde budou řešeny technické i administrativní otázky. V rámci plánovaných koordinačních schůzek budou přidělovány úkoly tak, aby jejich řešení vedlo k plnění stanovených měřitelných cílů. Z každé absolvované schůzky bude pořízen zápis o kontrole plnění úkolů vedoucích k dílčím cílům, zadání nových úkolů, a v případě potřeby budou vymezeny kritické body realizace a navržena případná opatření k nápravě. Každý člen týmu bude povinen dokumentovat svoji činnosti v míře dostatečné pro jeho eventuální zastoupení.

Začlenění struktur navrhovaného projektu do stávajících institucionálních struktur navrhovatele ÚEB AVČR bude řešeno formou vytvoření účetně samostatné jednotky v rámci organizační struktury ÚEB. Organigram (Příloha 2) uvádí začlenění navrhované jednotky centra excelentního výzkumu do struktur ÚEB s vyznačením vazeb na 5 laboratoří a mikroskopickou jednotku stávajícího VaV centra ÚEB a dále na partnerská VaV centra ÚMCH AVČR, IKEM a ÚPT AVČR.

### 3.4. Stávající výzkumné aktivity VaV centra/center související s aktivitami projektu

**VaV centrum navrhovatele ÚEB AVČR** realizuje v období posledních dvou let (2014-2015) řadu výzkumných aktivit v oblasti mikroskopického zkoumání struktur rostlinných buněk přímo navázaných na rozvoj pokročilé konfokální mikroskopie (viz. kap. 3.3). Jak je uvedeno v příloženém seznamu publikací (příloha 1), odhaleny byly především zásadní informace o pohyblivosti membránových přenašečů rostlinného hormonu auxinu, o zapojení membránových lipidů do signálních drah asociovaných s membránami, o proteinovém komplexu pro směrovanou dopravu složek buněčné stěny, o roli cytoskeletu ve vnitrobuněčném transportu a uspořádání buněčných povrchů a zejména o významu všech těchto procesů pro vývoj rostlin. V návaznosti na tyto velice kvalitní výstupy zahrnující řadu článků s počtem citací mezi 100x a 500x, byla i v letech 2014-2015 řešena řada projektů především v oblasti integrálních membránových proteinů, membránových lipidů, a mikrodoménového uspořádání membrán (příloha 3).

Výše uvedené aktivity nebyly podpořeny projekty v rámci programu OP VaVpl či OP VK. VaV centrum ÚEB AVČR je však partnerem projektu v rámci programu "Národní výzkumná infrastruktura pro biologické a medicínské zobrazování" (CzBI; <http://www.czech-bioimaging.cz/>) podpořené účelovou podporou MŠMT pro velké infrastruktury pro výzkum, experimentální vývoj a inovace (LM2015062, 2016-2019). Prostřednictvím tohoto projektu je VaV centrum ÚEB AVČR zapojeno do evropské sítě Euro-BioImaging (<http://www.eurobioimaging.eu/>) v rámci pražského uzlu, který byl vysoce hodnocen a je tak validován pro budoucí aplikace v rámci sítě ESFRI (European Strategy Forum on Research Infrastructures). V roce 2016 se VaV centrum ÚEB účastní formou žádost v rámci CzBI výzvy č. 02\_16\_017, "Výzkumné infrastruktury pro vzdělávací účely - budování či modernizace", kde se primárně soustředí na vylepšení instrumentace a jen velmi zanedbatelná část je

požadována na vědecké aktivity, které naopak tvoří hlavní aktivitu navrhovaného projektu excelentního výzkumu.

Předkládaný projekt je založen na rozvinutí několika výzkumných programů a aktivit, které jsou přímo navázané na aktivity VaV centra v oblasti studia struktury mezibuněčného materiálu, buněčných povrchů, buněčných stěn, plazmatické membrány a endomembránového systému rostlinných buněk. Seznam projektů s popisem jejich výzkumné agendy, které byly v ÚEB řešeny v letech 2014-2015, a které budou přímo dále rozvíjeny navrhovaným projektem, je uveden v příloze 3. Prostřednictvím předkládaného projektu VaV centrum ÚEB v maximální možné míře rozvíjí potenciál, který nastavilo svou činností vlastní pracoviště optické fluorescenční mikroskopie a počítá s jeho vylepšením o metody pokročilé elektronové mikroskopie.

Kvalitu stávajících výzkumných programů a aktivit v oblasti mikroskopického zkoumání rostlinných buněk lze dokumentovat řadou původních prací, které jsou založeny na pokročilé mikroskopické analýze. Nejlepších 10 publikací je uvedeno v příloze 4. Tematika mikroskopického výzkumu rostlinných buněk se podílí zhruba polovinou na celkové produkci publikačních výstupů ÚEB v časopisech s impakt faktorem vyšším než 5 a výzkumní pracovníci patří mezi přední v rámci ÚEB.

**VaV centrum partnerského pracoviště ÚMCH AVČR** realizovalo v období 2014-2015 řadu projektů (příloha 3) k vyvinutí postupů, jak velmi přesně řídit velikost částic v potřebném rozmezí pro biologické aplikace, tj. 10-20 mikrometrů pro gastrointestinální aplikace, 100-200 nm pro selektivní pasivní akumulaci v pevných nádorech, 50 nm pro optimální internalizaci do buněk a 5-20 nm pro překonání hematoencefalické bariéry v mozku. Zároveň se podařilo optimalizovat procesy přípravy tak, aby vznikaly částice s úzkou distribucí rozměrů. Pro terapeutické účely byly nanočástice testovány s protinádorovými léčivými, která mohou na rozdíl od jiných „drug delivery“ systémů být zabudována i nekovalentně, tj. výsledný produkt je novou formulací existujícího léčiva a nikoliv novou molekulou-novým léčivem, což velmi podstatně zkracuje schvalovací proces při zachování všech výhod tohoto přístupu. Pro diagnostické a radioterapeutické účely byly připraveny a testovány nanočástice s radionuklidy vhodnými pro neinvazivní zobrazování metodami PET a SPECT.

Podstatnou částí cesty k prakticky použitelnému systému je vhodná volba jeho chemické struktury a biodegradability. Proto členové týmu vyvinuli např. biodegradabilní nanočástice založené převážně na polyesterech nebo micelární systémy, které se rozpadají erozí nebo změnou pH a navíc mají extrémně nízkou (téměř nulovou) adsorpci proteinů na povrchu nanočástice díky ochranné vrstvě tvořené biokompatibilními polymery PEO, HPMA nebo nově polymery poly(2-alkyl-2-oxazolinového) typu. Tým má navíc rozsáhlé zkušenosti v oblasti polymerů specificky degradovatelnými reaktivními formami kyslíku a polymerních antioxidantů, jak v nanočásticových systémech pro kontrolované uvolňování farmak, tak v antioxidantních gelech pro hojení poranění (přípravek HEMAGEL® byl vyvinut na tomto pracovišti).

Soustředěný rozvoj aktivit týmu v oblasti nanočásticových systémů v posledních pěti letech je reprezentován více než třiceti publikacemi v prestižních mezinárodních časopisech, jako např. *Langmuir* (IF=4.38), *Macromolecular Rapid Communications* (IF=4,929), *Polymer Chemistry* (IF 5,368), *Journal of Controlled Release* (IF= 7,261), *Biomacromolecules* (IF=5,78), *Nanoscale* (IF=6,23). Mezinárodní odezva vědeckých výsledků týmu se též projevuje pozváním k publikaci referativních článků a kapitol v knihách a k plenárním přednáškám na zahraničních konferencích. Seznam nejlepších 10 publikací s citačním ohlasem a další relevantní publikace

jsou uvedeny v příloze 4. Atraktivita výzkumných aktivit členů týmu vede k vysokému zájmu o spolupráci ze strany mezinárodních partnerů, formou společných projektů, absolvování stáží, PhD studia či postdoktorských pobytů se členy týmu.

**VaV centrum partnerského pracoviště IKEM (ZRIR)** řeší v současné době v oblasti molekulárního a buněčného zobrazování několik výzkumných projektů, které jsou financované z různých zdrojů (GA ČR, AZV MZ ČR, GA UK). Při jejich realizaci spolupracuje z výše jmenovanými vědeckými partnery (viz kap. 3.3) a jejich seznam je uveden v příloze 3.

Žádná ze stávajících výzkumných aktivit IKEM nebyla podpořena v rámci programu OP VaVpl nebo OP VK. Prostřednictvím programu OP VK Institut realizoval v minulosti pouze jeden projekt, a to projekt s názvem „Dlouhověkost bez léků: Popularizace a propagace novinek ve výzkumu nefarmakologických možností ovlivnění zdravotního stavu“ (registrační číslo CZ.1.07/2.3.00/35.0039).

Výsledky výzkumných aktivit pracovníků IKEM jsou tradičně zveřejňovány formou vědeckých publikací. Mezi nejvýznamnějších 10 výsledků MR skupiny v letech 2009-2015 patří publikace uvedené v příloze 4. Publikační činnost pracovníků skupiny a celé ZRIR je poměrně rozsáhlá, včetně publikací v zahraničních časopisech s IF. Pracovníci ZRIR zasedají i v redakčních radách tuzemských a zahraničních odborných časopisů (Cardiovascular and Interventional Radiology, Contrast Media and Molecular Imaging, Cor et Vasa, Česká radiologie, Praktická radiologie). Prof. Peregrin (přednosta ZRIR) je prezidentem Nadace CIRSE (Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe) pro vzdělávání.

IKEM ke konci roku 2015 zaměstnával 73 vědeckých pracovníků, 10 nejlepších pracovníků je uvedeno s příslušnými scientometrickými daty v příloze 4.

Mezi nejvýznamnější výsledky aktivit **VaV partnerského centra EEM ÚPT AV ČR** v letech 2014-2015 patřila realizace přestavby unikátního experimentálního EREM AQUASEM II a otevření nové evropské laboratoře vysokorozlišovací environmentální elektronové mikroskopie vybavené mikroskopem QUANTA 650 FEG, jehož popis je uveden v kapitole 3.3. VaV centrum se dlouhodobě podílí na výzkumu a vývoji zákaznických řešení scintilačních detektorů pro elektronovou mikroskopii. Výsledkem jsou desítky realizovaných detektorů zpětně odražených elektronů pro firmy Hitachi, Jeol a FEI a např. také ve spolupráci s firmou Tecpa, s.r.o. a AutraDet unikátní Edge free světlovody pro detektory dodávané firmě Hitachi. Na základě smlouvy o spolupráci VaV centrum EEM dlouhodobě spolupracuje s firmou Crytur, jakožto světovým výrobcem scintilačních monokrystalů. Společně s touto firmou a firmou Tescan byl představen nový scintilační monokrystal CRY18 [1]. V oblasti výzkumu a vývoje ionizačních detektorů pro EREM je VaV centrum EEM světovou špičkou. V posledních letech byl centrem vyvinut unikátní scintilačně ionizační detektor sekundárních elektronů pro EREM [2, 3], umožňující realizaci dynamických in-situ experimentů v širokém rozsahu tlaků plynu od 0,0001 Pa do 1000 Pa v komoře vzorku EREM. Doposud jediný detektor na světě schopný detekovat energiově separovaný a značně zesílený signál v prostředí vysokého tlaku plynů EREM byl centrem patentován v roce 2011 [4]. V rámci řady projektů aplikovaného výzkumu agentur TAČR, MPO (projekty) VaV centrum EEM spolupracovalo s řadou firem na výzkumu různých materiálů z oblasti energetiky, elektrochemických senzorů, diferenčních tlakoměrů atd. VaV centrum EEM také vyvinulo a publikovalo řadu unikátních metod, např. pro studium morfologie lidských kmenových buněk v REM a EREM [5, 6], pro studium živých a experiment přezívajících malých živočichů v prostředí vysokého tlaku EREM [7, 8, 9], pro studium nativních povrchů rostlinných vzorků, zejména raných somatických embryí (Low temperature metoda



pro EREM) [10, 11] a rostlinných vosků [12], metodu pro opakované pozorování biologických vzorků v EREM [13] a metodu pro studium morfologie velmi citlivých biologických a polymerních vzorků [14, 15, 16]. VaV centrum EEM je v současné době jediné na světě, vlastníci technologie a know-how pro vysokorozlišovací morfologickou charakterizaci zcela nativních a vlhkých polyelektrolytových kapslí a částic [17, 18] a pro dynamické in-situ studium ledu [19, 20] pomocí EREM. Problematika charakterizace povrchu ledů pomocí EREM je v rámci společného projektu řešena s Univerzitou Cambridge. V oblasti Monte Carlo simulací interakcí signálních elektronů s plynem patří VaV centrum EEM mezi světovou špičku. Na základě aktivit několika projektů GAČR byla vytvořena první verze speciálního softwaru pro simulace trajektorií signálních elektronů v plynu a kvantifikaci množství signálních elektronů o specifických energiích dopadajících na ionizační detektor [21, 22]. Tento software představuje unikátní nástroj pro vývoj vysoce speciálních detektorů pro EREM. VaV centrum EEM se dlouhodobě zabývá simulacemi proudění plynů v EREM a optimalizací designu elektronově optických částí EREM z hlediska čerpání plynu [23, 24]. V rámci integrací nových technologií laserových mikromanipulačních technik, optické mikroskopie a Ramanovy spektroskopie do EREM spolupracuje VaV centrum EEM v rámci UPT AV ČR se skupinou optických mikromanipulačních technik vedenou Prof. Zemánkem [25]. Uvedené výzkumné aktivity byly realizovány za podpory centra ALISI, tedy v rámci projektu OP VaVpl. V rámci předkládaného projektu je plánován jejich další rozvoj, jak je popsáno v kapitole 5.3. Seznam referencí v tomto textu je uveden v příloze 3 jako doklad aktivity v rámci projektu ALISI.

### 3.5. Propojení výzkumu, vývoje a vzdělávání

**Navrhovatel ÚEB AVČR** je aktivní v oblasti pregraduálního i postgraduálního vysokoškolského studia, na konci roku 2015 pracovalo v ústavu 62 postgraduálních studentů (z toho 13 zahraničních) a celkem 151 pregraduálních studentů. Pracovníci ústavu vyučují pravidelně na několika vysokých školách v ČR, především na PŘF UK v Praze, VŠCHT a Univerzitě Palackého v Olomouci. Celkem v letech 2013-2015 odpřednášeli pracovníci ÚEB okolo 5000 h v bakalářském, magisterském a doktorském stupni studia. Společně s vysokými školami bylo na konci roku 2015 řešeno 24 projektů, 32 pracovníků ÚEB mělo částečný úvazek na vysoké škole, a 21 pracovníků vysokých škol mělo částečný úvazek na ÚEB. Pracovníci ÚEB zpracovávají oponentské posudky bakalářských, diplomových a disertačních prací pro řadu vysokých škol (PŘF UK, UP, ČZU, VŠCHT, FBMI, MU). Přehled aktuálních podílů na výuce v akreditovaných doktorských studijních programech je uveden v příloze 5.

VaV centrum navrhovatele ÚEB AVČR je zapojeno jak v přednáškové činnosti, tak ve školení mnoha studentů od talentovaných středoškolských, přes bakalářské a magisterské stupně až po postgraduální studenty. Tito vypracovávají v laboratořích centra své disertační práce. Partnery v této oblasti jsou především katedra experimentální biologie rostlin, katedra genetiky a mikrobiologie a katedra biochemie PŘF UK. Pracovníci stávajícího VaV centra jsou školiteli i konzultanty řady prací, jejichž seznam je uveden v příloze 5 a též v detailu v V každého člena týmu. Studenti akreditovaných programů se přímo podílejí na řešení výzkumných projektů centra.

**VaV centrum partnerského pracoviště SUPRAMOL ÚMCH AVČR** spolupracuje s Přírodovědeckou fakultou UK v Praze, Palackého univerzitou v Olomouci, Institutem klinické a experimentální medicíny, Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 1. lékařskou

fakultou UK v Praze, Přírodovědeckou fakultou Masarykovy univerzity v Brně. Partnerské pracoviště SUPRAMOL využívá akreditaci s Přírodovědeckou fakultou UK Praha pro obor makromolekulární chemie (studentka Loukotová), pro obor fyzikální chemie (studenti Rabyk, Holubová, Kaberov, Sincari) a pro obor analytická chemie (student Trousil), akreditaci s Matematicko-fyzikální fakultou UK v Praze pro obor Biofyzika (student Babuka) a akreditaci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze pro obor Chemie makromolekulárních látek (studentka Kolouchová). Pracovníci centra SUPRAMOL se aktivně účastní výuky na vysokých školách pořádáním odborných seminářů (Štěpánek, Hrubý) nebo výukou semestrálních kurzů (Hrubý) a vedením bakalářských a diplomových prací ve funkci školitele nebo školitele konzultanta (studenti Trousil, Brezaniová, Pospíšilová, Groborz).

**Partnerské pracoviště IKEM** se tradičně zabývá výchovou a doškolováním vědeckých pracovníků a lékařů prostřednictvím rozsáhlé výukové činnosti v rovině pregraduálního, postgraduálního i kontinuálního vzdělávání. IKEM je zapojen do výuky českých i zahraničních studentů všech tří pražských lékařských fakult Univerzity Karlovy, a to formou rozsáhlé přednáškové činnosti. Studentům dále poskytuje odborné a před atestační stáže a pořádá specializované semináře. Vybrané kliniky IKEM jsou přímo výukovými pracovišti fakult a mnozí lékaři IKEM jsou aktivními akademickými pracovníky na všech třech pražských lékařských fakultách UK.

Kromě lékařských fakult Univerzity Karlovy je IKEM intenzivně zapojen do výuky postgraduálních studentů v Institutu postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví (IPVZ) a podílí se na výchově a přípravě bakalářských, magisterských a Ph.D. studentů na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity, Přírodovědecké fakultě UK, Fakultě jaderné fyziky a inženýrství ČVUT, Fakultě potravinářské a biochemické technologie VŠCHT a Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK v Praze. V IKEM probíhá také vzdělávání středních zdravotnických pracovníků (ve spolupráci s IDPVZ) a lékaři a edukační sestry se významně podílejí na celoživotním vzdělávání sester a lékařů i mimo IKEM.

Přehled aktuálních akreditací doktorských studijních programů (akreditace udělené pracovištěm IKEM MŠMT) je uveden v příloze 5.

Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie ZRIR je do vzdělávání vědeckých pracovníků a lékařů zapojeno především prostřednictvím rozsáhlé přednáškové činnosti. Pracovníci přednášeli nebo se podíleli na několika předmětech na ČVUT a UK. V oblasti postgraduální výuky je ZRIR Subkatedrou intervenční radiologie IPVZ. Pořádá pravidelné kurzy v oblasti intervenčních metod a organizuje atestace v oboru intervenční radiologie. Řada pracovníků ZRIR se podílí na postgraduálních školeních IPVZ a pregraduální výuce v rámci jiných pracovišť (lékařské fakulty UK v Praze, FN Hradec Králové, FN Brno). Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie je akreditovaným pracovištěm pro výuku v nástavbovém oboru intervenční radiologie. Pracoviště má dále akreditaci MZ ČR pro postgraduální výuku radiologických asistentů - certifikovaný kurs - Zobrazování magnetickou rezonancí, dále odborná praxe - Zobrazování magnetickou rezonancí a odborná praxe - Zobrazovací postupy v intervenční radiologii a kardiologii. Pracovníci MR skupiny byli také organizátory projektu Klinické MR spektroskopie v rámci vzdělávací akce Evropské společnosti pro magnetickou rezonanci v medicíně a biologii „Lectures on MRI“.

Podrobnější informace o vzdělávání na jednotlivých pracovištích Institutu jsou k dispozici na webových stránkách IKEM: <http://www.ikem.cz/cs/vzdelavani/a-6/>.

**ÚPT AV ČR včetně jeho VaV centra (EEM)** má dlouholetou zkušenost ve spolupráci s vysokými školami v oblasti studijních programů a dalšího vzdělávání. Formou společných akreditací na vybraných studijních programech ÚPT AV ČR spolupracuje zejména s Vysokým učením technickým v Brně a Masarykovou univerzitou, ale také např. s Přírodovědeckou fakultou Univerzity Palackého v Olomouci. V roce 2015 působilo na ústavu 4 profesori a 4 docenti. Pracovníci ÚPT odpřednášeli v bakalářských, magisterských a doktorských programech celkem 495 vyučovacích hodin a vedli 30 disertačních prací. Seznam akreditovaných doktorských studijních programů, na jejichž výuce se ÚPT AV ČR podílí, je uveden v příloze 5.

V současné době vedoucí výzkumné skupiny EEM dr. Neděla vede dva studenty doktorského studijního programu Elektrotechnika a komunikační technologie. Jejich disertační práce jsou věnovány těmto tématům: Studium vlivu magnetického a elektrostatického pole na účinnost detekce sekundárních elektronů v prostředí vysokého tlaku plynů EREM a Detekce fotonů v prostředí vysokého tlaku plynů environmentálního rastrovacího elektronového mikroskopu. Uvedená témata zcela zapadají do výzkumných programů a aktivit ÚPT, na kterých se studenti v rámci svého doktorského studijního programu svou výzkumnou prací podílejí. Dr. Neděla se také podílí na výuce předmětu Elektrotechnické materiály, materiálové soustavy a výrobní procesy, jímž prochází studenti výše uvedeného doktorského studijního programu.

ÚPT se také věnuje podpoře mladých výzkumných pracovníků. V posledních dvou letech získali 2 mladí výzkumní pracovníci působící v rámci výzkumné skupiny EEM „Program podpory perspektivních lidských zdrojů - Mzdová podpora postdoktorandů na pracovištích AV ČR“. Oblast jejich výzkumu spadá do tematiky studia biologických vzorků v podmínkách nízkoenergievé environmentální rastrovací elektronové mikroskopie a výzkumu nových metod pro citlivé vodu obsahující vzorky v nativním stavu a výzkumu nanostrukturálních modifikací stavebních poživ kombinací metod environmentální elektronové mikroskopie a fyzikálně chemických analýz. Tato témata jsou zcela v souladu s výzkumným zaměřením výzkumné skupiny EEM.

Výzkumná skupina EEM organizuje jednou za dva roky s podporou ostatních výzkumných skupin ÚPT a spolupořádajících firem a partnerů Podzimní školu základů elektronové mikroskopie. Jedná se o pětidenní teoretický kurz s praktickými demonstracemi určený především pro studenty doktorských studijních programů, postgraduální studenty a začínající pracovníky v oblasti elektronové mikroskopie.

#### 4. CELKOVÉ CÍLE PROJEKTOVÉHO ZÁMĚRU

Aktivity projektu	
Aktivity, které bude projekt realizovat k naplnění celkových cílů projektu.	Rozvoj centra: a), b), d), e) a f).

## 5. VÝZKUMNÉ PROGRAMY, ROZVOJ INTERNACIONALIZACE, TÝM, INFRASTRUKTURNÍ VYBAVENÍ

### 5.1. Výzkumný program 1: Funkční mikroskopie rostlinných biomembrán a povrchů

#### Abstrakt

Biomembrány jsou komplexní strukturou tvořenou lipidy a proteiny. Jejich hlavní rolí je kompartmentace buněčných organel, které tvoří endomembránový systém všech eukaryotních buněk. Biomembrány však též tvoří, v podobě plazmatické membrány (PM), důležitou komunikační bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím buněk a organismů. Plní tak několik základních funkcí souvisejících jak s výměnou látek, tak s přenosem signálu. U rostlinných buněk představuje PM bariéru, která se směrem ven podílí na utváření buněčné stěny a povrchů jednotlivých orgánů. Opačným směrem PM řídí transport širokého spektra látek a určuje umístování jednotlivých komponent signálních drah asociovaných s PM.

Pochopení dynamické struktury PM a endomembrán, zejména fosfolipidového a proteinového složení by nebylo možné bez pokroku v mikroskopických technikách jejich studia. Tyto techniky byly dlouhou dobu omezeny na studium chemicky fixovaných preparátů neodrážejících věrně nativní strukturu membrán, buněčné stěny a povrchových struktur, nebo využívající málo specifická značení jejich lipidické či proteinové složky. Z tohoto důvodu je nutný přechod na neinvazivní, *in vivo* způsob mikroskopické analýzy, která bude umožňovat jak specifické označení proteinových či lipidových struktur, tak jejich snímání ve vysokém rozlišení. Záměrem tohoto výzkumného programu je v návaznosti na stávající aktivity VaV centra ÚEB AVČR dosáhnout pomocí podstatného rozvoje *in vivo* mikroskopických technik ve spolupráci s partnery (ÚPT AV ČR a IKEM) a specifického značení (ÚMCH AV ČR) pokroku v pochopení struktury PM, endomembránového systému a povrchů rostlinných buněk. Hlavní dva cíle, kterých chceme tímto programem dosáhnout je 1) Objasnit význam dynamiky biomembrán ve vývoji rostlin a 2) Identifikovat složení buněčných povrchů a mezibuněčných prostor u rostlin.

#### 5.1.1. Vazba na výzkumné programy centra, rozvoj centra

Tento výzkumný program je navrhován jako přímé pokračování několika výzkumných aktivit VaV centra ÚEB AVČR, které jsou popsány podrobně v kapitole 3.4. Všechny tyto aktivity představují vysoce kvalitní výzkum, který byl v posledním desetiletí prováděn ve VaV centru ÚEB AVČR s důrazem na pokročilé techniky fluorescenční mikroskopie rostlinných biomembrán, cytoskeletu, buněčné stěny a povrchů buněk. Hlavní myšlenkou tohoto výzkumného programu je dále vylepšit a technicky podpořit výzkumné aktivity, které již přinesly kvalitní originální výsledky publikované ve vysoce kvalitních vědeckých časopisech. Pokročilé zobrazovací techniky konfokální laserové skenovací mikroskopie (FRAP, FRET, RICS, FCS, spektrální analýza, analýza kolokalizace), konfokální mikroskopie na principu rotujícího disku (kymografická analýza) a strukturovaného osvětlení, všechny optimalizované výzkumnými týmy VaV centra ÚEB AVČR, budou posunuty na kvalitativně novou úroveň přidáním expertízy neinvazivní elektronové mikroskopie, jakož i dramatického zlepšení ve specifickém značení součástí rostlinných membrán a povrchů. Ačkoliv pro ÚEB AVČR tento

výzkumný program představuje především aktivitu typu "curiosity-driven", zapojení tří dalších partnerů do tohoto centra excelentního výzkumu otevře několik nových obzorů pro orientovaný výzkum v oblasti nanotechnologií.

### 5.1.2. Současný stav poznání

Cílem tohoto výzkumného programu je přispět k pochopení struktury plazmatické membrány (PM), endomembránového systému a povrchů rostlinných buněk. V souladu se strategií tohoto návrhu centra excelentního výzkumu, bude tento výzkumný program primárně zaměřen na pokročilé zobrazovací techniky kombinující metody světelné a elektronové mikroskopie. Taková kombinace technik představuje velmi unikátní příležitost dosáhnout výrazného pokroku jak v oblasti biologie eukaryotických buněk, tak v oblasti vývoje pokročilé instrumentace.

PM, které slouží jako rozhraní s okolním prostředím, je určujícím rysem všech živých buněk. Současné modely postulují, že PM je laterálně organizována do podoby domén s různorodým proteinovým a lipidovým složením s rozmanitou prostorovou a časovou charakteristikou (Jarsch et al., 2014; Sekereš et al., 2015). Existence takových více typů domén byla navržena jako rozhodující pro efektivní usměrňování buněčné signalizace, membránového transportu a komunikace (Malínský et al., 2013). Dynamika těchto domén a jejich proteinové a lipidové složky je pevně spojena s kortikální cytoplazmu prostřednictvím cytoskeletální sítě, tj. aktinových filament (AFs) a mikrotubulů (MTs). Role vysoce dynamických rostlinných AFs (Henty-Ridilla et al., 2013) v dynamice endosomálního systému je dáno činností myosinů (Brandizzi a Wasteneys, 2013; Ueda et al., 2015). Dynamika AFs a MTs je specificky regulována GTPázami typu Rop (Rho of plants), které působí jako upstream aktivační faktory pro oba cytoskelety (Chen a Friml, 2014).

Zejména díky jejich intenzivní výzkumu mohou auxinové přenašeče představovat typ membránového "nákladu", na kterém mohou být snadno studovány mechanismy intracelulární dynamiky membránových proteinů. Ačkoliv protein klatrin byl popsán jako důležitá součást recyklační mašinerie, která zajišťuje vnitrobuněčnou dopravu některých auxinových přenašečů PIN, není známo, jak membránový váček s klatrinem (clathrin-coated vesicle) může být připojen k akto- myozinovému systému a které myosiny mohou ovlivnit lokalizaci auxinových přenašečů v PM. Stejně tak role dynaminů, které asistují oddělování membrán při vzniku membránových váčků, je nejasná. Vnitrobuněčná doprava proteinů PIN byla sledována pomocí konfokální mikroskopie v naší laboratoři v několika studiích. Ukázali jsme, že dynamin DRP1A interaguje s proteinem PIN2 na rostoucích koncích buněčné destičky během cytokineze (Mravec et al., 2011), že depozice tohoto proteinu do PM se řídí jeho ubiquitylací (Leitner et al., 2012), a také že endocytóza proteinů PIN tabáku je závislá na cytoskeletu a zahrnuje aktivitu NtGNL1, guaninového GTP výměnného faktoru (Jelínková et al., 2015). Naše současná data z techniky FRAP a fluorescenční spektroskopie ukazují, že pohyblivost auxinových přenašečů v membráně je do různé míry závislá na cytoskeletu. (Laňková et al., 2016). Předběžná mikroskopická data též dále ukazují, že i jednoduchá mutace v jednotlivých genech kódujících alfa a beta tubuliny, vyvolává změny v rozložení proteinů PIN1 a PIN2 v kořenech rostlin *Arabidopsis*. Pro propojení dynamiky proteinů PIN s MTs byla nedávno ukázána důležitá interakce plus konců MTs s proteinem CLASP (Ambrose et al., 2013). Přenašeče auxinu jsou udržovány v plazmatické membráně též prostřednictvím propojení se strukturou buněčné stěny (BS), které představuje další překážku determinující pohyblivost membránových proteinů (Martinière et al., 2012; Feraru et al., 2011).

Buněčná stěna představuje unikátní strukturu rostlinných organismů. Buněčné stěny propojují rostlinné buňky v pletiva. Představují mechanickou oporu, zároveň však se zvětšujícím se protoplastem dokážou růst až na mnohonásobky svého původního objemu při zachování mechanických vlastností. Buněčná stěna je místo mnoha metabolických dějů, může být využita ke skladování látek, a především je modifikována depozicemi dalších materiálů, což vede ke zpevnění, znemožnění průniku vody a látek, a průniku patogenů. Kromě těchto fascinujících vlastností je buněčná stěna ekonomicky významnou strukturou. Hlavní mechanická složka buněčné stěny, tedy celulóza, je rozsáhle využívána v průmyslu i každodenním životě lidské společnosti. V současnosti stále není k dispozici účinná metoda syntézy celulózy *in vitro*, proto jsme odkázáni na rostlinné buněčné stěny jako na jediný zdroj této látky.

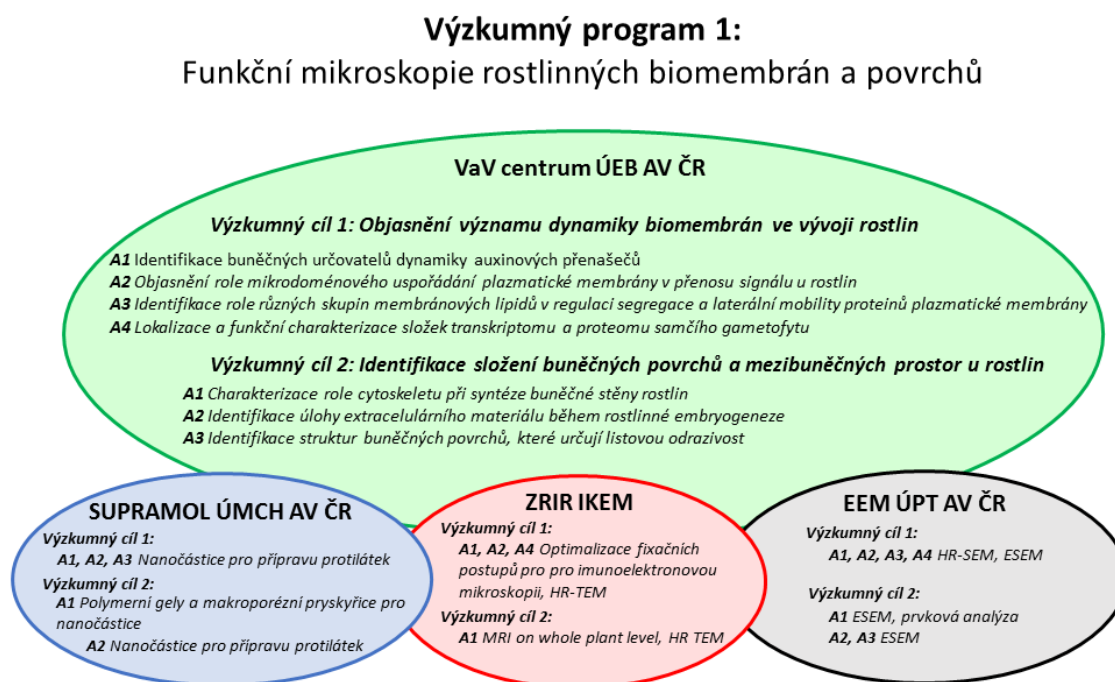
Modely, které jsou dnes používány pro studium biomembrán a povrchů, zahrnují syntetické membránové váčky, protoplasty izolované z různých buněčných typů, buněčné kultury, klíčnicí rostliny různých stář a též intaktní rostliny, reprezentované především modelem *Arabidopsis thaliana*. Nejeftektivnější je studium dynamiky PM a syntézy buněčné stěny v polarizovaných prodlužujících se buňkách, které jsou zastoupeny v tomto projektu jednotlivými tkáněmi kořene a stonku a zahrnují jak difúzně rostoucí buňky kořene a hypokotylu, tak vrcholově rostoucí kořenové vlásky a pylové láčky (samčí gametofyt). Kromě toho je syntéza BS a složení povrchových vrstev často studováno v buňkách s komplexní morfologií, jako jsou např. epidermální laločnaté buňky rostlin. Ve všech těchto systémech jsou mikroskopické techniky používané v posledním desetiletí převážně do značné míry invazivní a nepovolují studium struktury PM, buněčné stěny a buněčných povrchy *in vivo* a současně ve vysokém detailu. Tento fakt je řešen v tomto výzkumném programu kombinací expertíz tří partnerů podporující dohromady VaV centrum ÚEB AV ČR (viz obr. 5.1.1). Kromě technik pokročilé fluorescenční mikroskopie, optimalizovaných v ÚEB AV ČR, bude tento program využívat pokroky v environmentální elektronové mikroskopii partnera ÚPT AVČR a nově navržených nanočástic partnera UMCH AV ČR za účelem posunutí mikroskopie na kvalitativně zcela novou úroveň.

Identifikace a pozorování struktur ve vysokém rozlišení za nativních podmínek a ideálně se specifickým označením studované struktury představuje stimul, který posune jak základní výzkum v oblasti buněčné biologie rostlin, tak bude potenciálně důležitý pro praktické aplikace. Ty zahrnují např. cílení specifických nanočástic do buněčných kompartmentů, které v případě BS otvírají nové možnosti v cílených modifikacích textilní bavlny.

Téma tohoto výzkumného programu představuje vysoce interdisciplinární výzkumnou činnost, jejíž úspěch závisí na vysoce kvalitním výzkumu v oblasti buněčné biologie rostlin (ÚEB AV ČR), humánní a zvířecí buněčné biologie (IKEM), makromolekulární chemie (UMCH AVČR) a vývoji nové mikroskopické instrumentace (ÚPT AVČR). Oba hlavní výzkumné cíle, které jsou specifikovány níže, obsahují několik experimentálních aktivit s jejich milníky. Tyto milníky představují úspěchy, které jsou jak vědecky vynikající, s velkým publikačním dosahem, tak jsou ambiciózní na mezinárodní úrovni, což umožní dále zvýšit mezinárodní reputaci navrhovaného centra excelentního výzkumu. Přestože hlavním cílem tohoto výzkumného programu je spíše základní interdisciplinární výzkum, charakter tohoto centra excelentního výzkumu má potenciál produkovat výsledky, které povedou k aplikačním uplatněním, především v oblasti nanotechnologií rostlin a hlavně v oblasti podstatného vylepšení funkční *in vivo* mikroskopie.

### 5.1.3. Výzkumné cíle, aktivity a výsledky

Tento výzkumný program je vázán primárně na VaV pracoviště ÚEB AVČR. Interdisciplinární charakter tohoto výzkumu je patrný z mnoha společných realizací v rámci 2 výzkumných cílů a celkem 7 aktivit. Jejich schematické zobrazení je uvedeno v Obr. 5.1.1. Podrobný popis každého výzkumného cíle a každé aktivity je popsán v následujícím textu.



**Obrázek 5.1.1: Schematické zobrazení výzkumného programu 1.** Těžištěm tohoto výzkumného programu je VaV pracoviště ÚEB AV ČR (zelená). Zapojení partnerských VaV pracovišť, SUPRAMOL ÚMCH AV ČR (modrá), ZRIR IKEM (červená) a EEM ÚPT AV ČR (šedivá) je specifikováno pro jednotlivé výzkumné aktivity ÚEB AV ČR.

#### **Výzkumný cíl 1: Objasnění významu dynamiky biomembrán ve vývoji rostlin**

Jak bylo uvedeno v kapitole 5.1.2, biomembrány včetně PM se skládají z dynamické směsi fosfolipidů a bílkovin, která podléhá neustálé obměně. Vzhledem k tomu, že PM představuje významný spoj mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem, její dynamika nutně určuje řadu signalizačních událostí. Tyto zahrnují umístování integrálních membránových proteinů a proteinových komplexů s různými funkcemi jako je sběr světelné energie, přenos různých iontů, přeprava širokého spektra molekul s nízkou molekulovou hmotností, příjem ligandů s následným přenosem signálu a přestavba membrány pro exo- and endocytotické procesy. Transport membránových vezikulů je zodpovědný za obrat biomembrán mezi PM a endomembránovým prostorem buňky a tento proces je regulován na více úrovních pro jemné vyladění složení lipidů a bílkovin na membráně.

Tento výzkumný cíl obsahuje 4 aktivity, které se zabývají 3 aspekty dynamiky membrán, tj. jak je distribuce integrálních a periferních membránových proteinů regulována (aktivity 1 a 4), jak jsou membránové proteiny uspořádané do mikrodomén (aktivita 2) a jaký je význam spolupráce lipidické a proteinové složky membrán (aktivita 3). Výzkum bude prováděn na

pracovišti VaV centra navrhovatele ve spolupráci se třemi partnerskými VaV centry (Obr. 5.1.1.). Celkem 4 výzkumné aktivity jsou tyto: 1) Identifikace buněčných určovatелů dynamiky auxinových přenašečů 2) Objasnění role mikrodoménového uspořádání plazmatické membrány v přenosu signálu u rostlin 3) Identifikace role různých skupin membránových lipidů v regulaci segregace a laterální mobility proteinů plazmatické membrány a 4) Lokalizace a funkční charakterizace komponent transkriptomu a proteomu samčího gametofytu.

### **Aktivita 1: Identifikace buněčných určovatелů dynamiky auxinových přenašečů**

**Vedoucí aktivity:** RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Rostlinný hormon auxin hraje významnou morforegulační roli během vývoje přisedlého rostlinného těla (Vanneste a Friml, 2009). Vytváření koncentračních gradientů auxinu v rostlinných pletivech je závislé především na aktivitě a lokalizaci jeho přenašečů z proteinových rodin AUX1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX), PINFORMED (PIN) a ABCB (Petrášek a Friml, 2009). Tyto přenašeče podléhají dle konkrétního vývojového programu, recyklování mezi PM a endomembránovým prostorem buněk (Luschnig a Vert, 2014). Proces recyklace, který zahrnuje jak exocytózu, tak endocytózu (Richter et al., 2009), určuje schopnost konkrétního přenašeče být dopraven do jiné domény v PM bez nutnosti *de novo* proteosyntézy. Ačkoliv molekulární mechanismy regulující dopravu váčků a role auxinu v těchto procesech je intenzivně studována (Offringa and Huang, 2013), doprava jednotlivých auxinových přenašečů je popsána jen částečně. Nejlépe je charakterizována doprava auxinových přenašečů PINj, které zahrnuje malé GTPázy, endocytózu závislou na klatrinu (Kleine Vehn a Friml, 2008), exocytózu závislou na komplexu exocyst (Drdová et al., 2013) a také závisí na sterolovém složení PM (Men et al., 2008). Fosforylace a de-fosforylace proteinů PIN reguluje jejich dopravu do různých oblastí PM (Habets a Offringa, 2014). Doprava proteinů z rodin AUX1/LAX a ABCB také zahrnuje činnost malých GTPáz a je závislá na sterolovém složení PM, ale podrobnosti tohoto procesu prozatím chybí.

Jednou z hlavních informací, která stále chybí je informace o lokalizaci jednotlivých auxinových přenašečích na subcelulární a ultrastrukturální úrovni. V rámci této aktivity se budeme soustředit na testování "ultrastrukturálních fenotypů" tj. na lokalizaci jednotlivých auxinových přenašečů v kolekci linií *Arabidopsis thaliana* nesoucích mutace v genech kódujících cytoskeletální proteiny, proteiny asociované s cytoskeletem, enzymy pro syntézu BS a sterolů. Metody super-resoluční fluorescenční mikroskopie, pokročilé konfokální mikroskopie, fluorescenční korelační techniky a stejně tak vysokorozlišovací elektronové mikroskopie a environmentální rastrovací elektronové mikroskopie bude využity ve spolupráci s partnery z EEM ÚPT AV ČR (obr. 5.1.1).

Hlavní hypotéza, která bude experimentálně testována, je že se jednotlivé druhy přenašečů auxinu liší v jejich spojení s cytoskeletem a že toto spojení určuje jejich funkci. Přidanou hodnotou tohoto projektu bude vytvoření webové databáze ultrastrukturálních snímků a hodnot popisujících dynamiku a funkci auxinových přenašečů s ohledem na struktury cytoskeletu, PM a BS. Tato databáze by mohla být dále rozšířena v budoucnosti a může sloužit jako neocenitelný zdroj informací pro experimentální biologie.

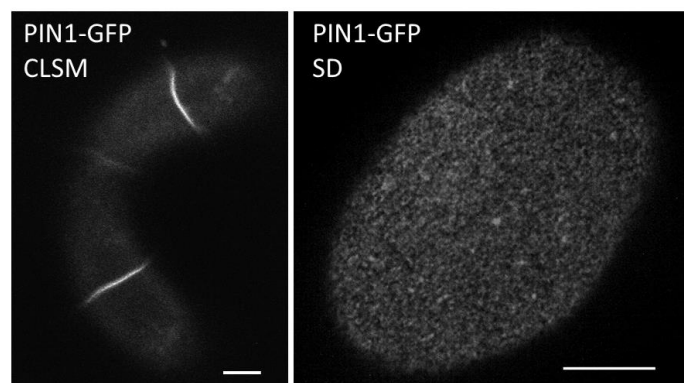
**Tato aktivita se skládá ze tří hlavních oblastí.**

**Za prvé, budou definovány buněčné struktury určující lokalizaci a dynamiku auxinových přenašečů.** Prvním krokem bude vytvoření molekulárních nástrojů pro zobrazení auxinových přenašečů nepřímou imunofluorescenční metodou a pomocí *in vivo* technik s návazným systematickým mikroskopickým pozorováním pomocí několika pokročilých technik v kolekci inserčních mutantů *Arabidopsis thaliana*. Tato kolekce je již ustavena v navrhovatelské



laboratoři. Pro MTs kolekce obsahuje inserce v genech pro tubulinové isoformy, proteiny asociované s MTs, plus konec vazebné proteiny, mikrotubuly stabilizující a štěpící proteiny, nukleační faktory a několik dalších regulátorů polymerace MTs. Pro AFs kolekce obsahuje inserce v genech pro aktinové isoformy, nukleační faktory a aktin vazebné proteiny. Konečným cílem je vytvořit co možná nejširší kolekci, které by představovala všechny v současné době popsané proteiny asociované s cytoskeletem a současně ty, které mají dostupné mutantní rostliny. V tuto chvíli je k dispozici okolo 40 ověřených linií, v plánu je cca 50 dalších, které budou zahrnovat též mutanty v tvorbě BS a syntézy a depozice sterolů.

K prohledávání a třídění lokalizací auxinových přenašečů budou zapotřebí jak specifické protilátky, tak translační fúze s fluorescenčními proteiny. V prvním kroku budeme připravovat specifické protilátky proti několika auxinovým přenašečům. V tuto chvíli již máme funkční, většinou komerční (Agrisera, NASC), polyklonální protilátky proti PIN1, PIN2, PIN3 a PIN4 z *Arabidopsis*. Používají se pravidelně v laboratoři pro imunoznačení v klíčcích rostlinách *Arabidopsis* pomocí automatizované barvicí stanice (Intavis Pro VSi). Optimalizovaný protokol umožňuje současné označování dvou auxinových přenašečů z buňky pomocí zeleně a červeně označené sekundární protilátky (Alexa, Invitrogen). Protilátky proti proteinům AUX1/LAXes a ABCBs budou vyráběny komerčně (nejsou k dispozici v současné době). Připraveny též budou nové genové konstrukty nesoucí geny pro auxinové přenašeče v translační fúzi s fotoaktivovatelnou verzí GFP (PA-GFP) pro fotoaktivační lokalizační mikroskopii (PALM) a stejně tak s dalšími spektrálními variantami fluorescenčních proteinů pro následné kolokalizace. Bude též nezbytné provádět genotypování linií a ověření expresí pomocí qRT-PCR u všech mutantů v tomto projektu. Pro *in vivo* přístup již započalo křížení markerových linií s mutantními liniemi, vytvořeny máme křížence s mutanty v tubulinových a aktinových genech pro všechny proteiny PIN ve fluorescenční fúzi pod přirozenými promotory. Nečekáme žádná úskalí během generování souboru protilátek a markerových linií, ale je možné, že budeme muset vyzkoušet více verzí protilátek vytvořených pomocí oligopeptidů syntetizovaných v různých částech sekvence příslušného přenašeče.

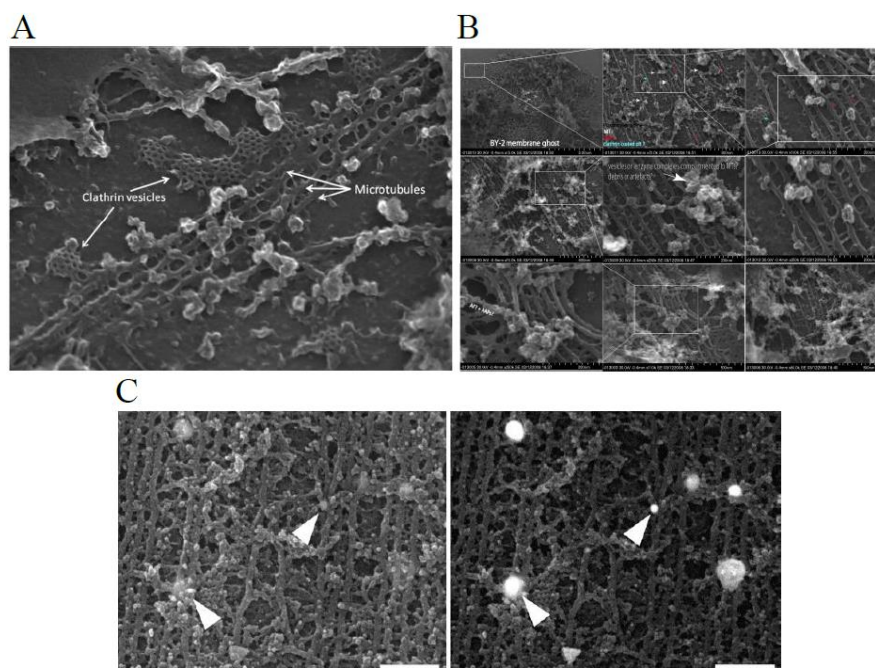


**Obrázek 5.1.2: Distribuce proteinů PIN v plazmatické membráně a kortikální cytoplazmě *in vivo*.** PIN1::PIN1:GFP v tabákových buňkách BY-2 cells pozorován pomocí CLSM (nalevo) či spinning disk (SD) mikroskopu (napravo). Oproti CLSM umožňuje SD zobrazení heterogenity v oblasti PM, kterou lze navíc sledovat *in vivo* či kvantifikovat distribuci po chemické fixaci vzorku. Měřítka 10 $\mu$ m.

Na základě našich předběžných výsledků ukazujících změněnou lokalizaci jednotlivých proteinů PIN v kořenech, budeme cíleně prohledávat lokalizace v kontrolních a mutantních rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Zaměříme se na kořen, hypokotyl, děložní lístky a nakonec na první pravé listy a sledovat budeme expresní domény jednotlivých přenašečů auxinu. Toto

základní prohledávání bude laserovou konfokální mikroskopií, pozornost bude soustředěna jak na celulární a subcelulární úroveň s využitím objektivů s vysokou numerickou aperturou. Současně budou pořizována *in vivo* data v liniích kříženců mutantů a markerových liniích pro všechny auxinové přenašeče. Tento klasický přístup bude doplněn o spinning disk (SD) mikroskopií, kde jsou jednotlivé mikrodomény obsahující přenašeče auxinu snadno pozorovatelné (obr. 5.1.2). *In vivo* budeme též provádět korelační spektroskopii kombinovanou s metodou FRAP v kořenech mutantů *Arabidopsis thaliana* podle postupu popsaného nedávno v naší laboratoři (Laňková et al., 2016).

Kromě výše zmíněné fluorescenční mikroskopie, fixované vzorky budou analyzovány pomocí vysokorozlišovací elektronové mikroskopie (HR-SEM) na pracovišti partnera EEM ÚPT AVČR. Jak je znázorněno na obr. 5.1.3, v naší laboratoři jsme optimalizovali protokol pro přípravu vzorků pro vysoce kvalitní HR-SEM PM a přilehlé oblasti. Tato technika využívá protoplastů izolovaných z rostlinného pletiva (tabák, *Arabidopsis*) a přípravu membránových svlečků či duchů, tzv. "membrane ghosts" (Krtková et al., 2012b). Tato frakce obsahuje PM a mnoho navázaných proteinů z oblasti kortikální cytoplazmy. Její následná fixace (Fišerová a Goldberg, 2014) dává velmi dobré výsledky a struktury mohou být rozeznány na základě jejich morfologie, které umožňují jasné identifikace mnoha struktur v rámci regionu pod plazmatické membrány, která by bylo možné snadno identifikovat na základě jejich morfologie (Obr. 5.1.3A, B). Navíc bude tato technika kombinována se specifickým imunoznačením s využitím sekundární protilátky s navázanými nanočásticemi zlata (Obr. 5.1.3C) či fluoru, což umožní aplikovat korelativní přístup kombinující fluorescenční a elektronovou mikroskopie (Goldberg and Fišerová, 2010). Další nanočástice pro tuto techniku budou připravovány na partnerském VaV pracovišti SUPRAMOL ÚMCH AV ČR. Vývoj přístrojové techniky partnera EEM ÚPT AV ČR navíc také umožní aplikaci *in vivo* přístupu na elektronově mikroskopické úrovni prostřednictvím techniky environmentální rastrovací mikroskopie (EREM). I pro EREM máme v plánu využít techniku imunocytochemického zobrazení podle Rosso et al (2013) a ve spolupráci s VaV centrem z IKEM dále vylepšit postup fixace buněk tabáku a *Arabidopsis*, stejně tak jako histologických preparátů kořene, děložních listů a hypokotylů *Arabidopsis* (Obr. 5.1.1).



**Obrázek 5.1.3: Vysokorozlišovací rastrovací elektronová mikroskopie (HR-REM). (A, B)** Vzorky membránových svleček izolované z tabákových buněk BY-2. Struktury mikrotubulů a klatrinových váčků **(A)**. Komplexita struktur pozorovatelných HR-SEM **(B)**. (Fišerová, J., Goldberg, M. nepublikováno). **(C)** HR-SEM po imunoznačení zlatými částicemi mikrotubulus-vazebného proteinu EB1 ze svleček pokožky *Tradescantie*. Sekundární elektrony (vlevo) a odražené elektrony (vpravo), Barton et al., (2008).

**Za druhé, budou identifikovány nové určovatelé dynamiky auxinových přenašečů.** Postup zvolený pro přípravu vzorků pro HR-REM, tj. příprava membránových svleček, bude využit i zde k získání frakce pro izolaci proteinů, které jsou v asociaci s PM v oblasti kortikální cytoplazmy. Protoplasty budou izolovány z kořenů *Arabidopsis thaliana* pomocí enzymatické digesce. Tato technika je již v laboratoři zavedená (Krtková et al., 2012b). Stejný přístup bude uplatněn v kolekci mutantních linií. Pomocí imunoprecipitace s využitím specifických protilátek proti auxinovým přenašečům bude možné získat frakce, které obsahují možné interakční partnery studovaných přenašečů. V příslušném mutantu budou některé z těchto interakcí scházet nebo se nově objevovat. Budeme identifikovat tyto interakční partnery interakce pomocí hmotové spektrometrie (MALDI). Opačný přístup, tj. využití protilátek proti již navrženým interakčním partnerům s následnou analýzou bude též aplikováno v těchto frakcích. Tento přístup bude doplněn následně doplněn kolokalizačními experimenty identifikovaných kandidátů s auxinovými přenašeči.

**Za třetí, bude vytvořen webový katalog lokalizací, dynamiky a funkce a interakcí pro auxinové přenašeče.** Protože celá tato aktivita je spojena s vytvořením velkého objemu obrazových dat, budou tato data vyhodnocována pomocí obrazové analýzy k podchycení i drobných změn v lokalizacích auxinových přenašečů. V databázi budou integrována data z CLSM, SD, HR-REM i EREM a provedena korelativní měření v případech, kde to bude možné.

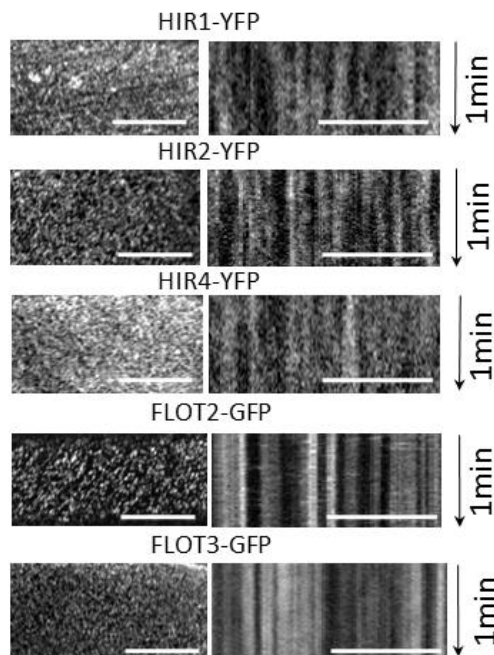
**Milníky: Webový katalog-lokalizací obsahující nové určovatele dynamiky auxinových přenašečů vytvořený z dat získaných pomocí pokročilé fluorescenční mikroskopie a elektron mikroskopických přístupů.**

## **Aktivita 2: Objasnění role mikrodoménového uspořádání plazmatické membrány v přenosu signálu u rostlin**

**Vedoucí aktivity:** RNDr. Jan Martinec, CSc.

Naše práce si klade za cíl pomocí molekulárně biologických metod a pokročilé fluorescenční a elektronové mikroskopie objasnit úlohu mikrodomén, resp. proteinů podílejících se na jejich tvorbě, na příjmu a zpracování signálů vnějšího prostředí. Tato aktivita přímo navazuje na činnost laboratoře v oblasti signálních aktivit asociovaných s PM (Krtková et al., 2012a; Krčková et al., 2015; Matoušková et al., 2014; Pejchar et al., 2015) a zejména projektu zaměřeného na flotiliny a jejich rostlinné homology (viz. kap. 3.4). Flotiliny a HIRs (Hypersensitive Induced Reaction proteins) jsou periferní membránové proteiny, které byly lokalizovány v naší laboratoři v diskrétních PM mikrodoménách (Obr. 5.1.4), které odpovídají povahou dříve publikované distribuci podobných proteinů (Jarsch et al., 2014). Tato lokalizace je odrazem heterogenity v uspořádání PM a odpovídá velmi pravděpodobně oblastem s vyšší uspořádaností, tzv. lipid ordered phase (Lo fáze). V těchto oblastech může docházet k agregaci proteinů o různé funkci (např. receptory, iontové kanály, fosfolipázy) a mohou tak sloužit jako signalizační nebo odpovědní centra v rámci buňky (Konrad and Ott, 2015; Tapken and Murphy, 2015). Role flotillinů a HIRs v utváření a funkci těchto oblastí není u rostlin zcela jasná, poznatky z živočišných homologů ukazují na schopnost flotillinů vázat různé proteiny (kinázy, receptory, transportéry, aktin) přímo nebo přes další partnery. Není též jasné, zdali mohou

rostlinné flotiliny plnit podobnou roli jako u živočichů, tj. asistovat při endocytóze membránových receptorů (Fan et al., 2015).



**Obrázek 5.1.4: Lokalizace a dynamika proteinů HIR a flotillinů (HIR1-YFP, HIR2-YFP, HIR4-YFP, FLOT2-GFP, FLOT3-YFP) v prodlužujících se buňkách pokožky kořene *Arabidopsis thaliana*.** SD mikroskopie. Měřítka 10 $\mu$ m (nalevo) and 5  $\mu$ m (napravo). Nalevo, mikrodomény PM různých velikostí pro všechny testované proteiny. Napravo, kymografická analýza (1 min) ukazující statické domény pro oba flotiliny oproti dynamickým doménám proteinů HIR.

**Tato aktivita se skládá ze tří hlavních oblastí.**

**Za prvé, bude stanoveno jak se flotiliny a HIR proteiny podílejí na tvorbě Lo fáze v PM.** Budou využity fluorescenční próby s různou emisí v Lo resp. Ld (lipid-disordered) prostředí (Laurdan, di-4-ANEPPDHQ) v rostlinném materiálu s různou úrovní exprese rostlinných flotillinů nebo HIRs, jak s nadprodukcí (35S), tak s absencí jednoho či více proteinů (CRISPR-Cas9). V těchto rostlinách bude prováděna CLSM mikroskopie, mikroskopie se strukturovaným osvětlením a SD mikroskopie. Identita mikrodomén bude farmakologicky testována po ovlivnění sterolového složení PM pomocí filipinu a methyl- $\beta$ -cyklodextrinu.

**Za druhé, interakce flotillinů, HIR proteinů a jejich interaktorů bude studována in vivo.**

Jedním z nejdůležitějších výsledků předchozího projektu byla imunoafinitní purifikace skupiny interakčních partnerů flotillinů a HIR proteinů s následnou identifikací pomocí LC-MS/MS (Junková et al., in preparation). Geny kódující vybrané kandidáty budou exprimovány v translačních fúzích s fluorescenčními proteiny a interakce testována pomocí konfokální mikroskopie s kolokalizační analýzou a FRET. Inhibitory endocytózy a váčkového transportu budou využity k testování dopravy komponent mikrodomén mezi endomembránovým prostorem a PM. Imunofluorescenční značení pomocí specifických protilátek bude dále využito k testování dimerizace flotillinů a jejich homologů. Ve spolupráci s partnerskými VaV centry IKEM a SUPRAMOL ÚMCH AV ČR (Obr. 5.1.1.) budou připraveny protilátky značené zlatem a dalšími nanočásticemi a vzorky analyzovány pomocí TEM (IKEM), HR-REM a EREM (EEM ÚPT AV ČR). Elektronová mikroskopie přinese větší detail při studiu mikrodomén, plánujeme ji však doplnit i o super rezoluční mikroskopii dostupnou v rámci uzlu projektu CzBioimaging.

**Za třetí, bude studována signální role flotillinových a HIR mikrodomén v reakci na změny v podmínkách prostředí.** Vedle v literatuře popsané změněné transkripce genů pro jednotlivé flotiliny a HIRy v reakci na různá stresová působení lze očekávat i změny v lokalizaci a fyzických interakcí v rámci mikrodomén (Qi et al., 2011). Proto bude v našich experimentech testováno spektrum biotických a abiotických stresorů (chlad, vysoká teplota, hypoxie, bakteriální a houbové patogeny) a následně hodnocena povaha mikrodomén, hlavně jejich agregace a rozpad či oligomerizace a disociace. Využity budou metody konfokální mikroskopie pro hodnocení dynamiky a interakcí proteinů (FRAP and FRET). Kvalitativně nové informace budou získány pomocí nativní environmentální elektronové mikroskopie ve spolupráci s partnerským VaV centrem EEM ÚPT AV ČR (Obr. 5.1.1.), též s využitím specifických protilátek připravených v předchozí části této aktivity.

**Milníky: Soubor dat o složení mikrodomén v rostlinné PM.**

### ***Aktivita 3: Identifikace role různých skupin membránových lipidů v regulaci segregace a laterální mobility proteinů plazmatické membrány***

**Vedoucí aktivity:** Ing. Martin Potocký, Ph.D.

Jak již bylo uvedeno v úvodu tohoto výzkumného programu, spolupráce lipidické a proteinové složky PM není dobře poznána a proto tento výzkumný program se zaměřuje na mechanismy definující tuto dynamickou souhru.

V posledních 15 letech, malé kyselé membránové fosfolipidy jako je fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP2) či fosfatidová kyselina (PA) byly prokázány v mnoha regulačních procesech, které jsou vázány na PM. PA a PIP2 spolu s dalšími fosfoinositidy jsou nyní považovány za více než jen prekurzory nebo meziprodukty v klasických signálních kaskádách a jejich role v cílení efektorových proteinů do různých domén PM nebo v modulaci PM zakřivení je nesporná (Sekeress et al., 2015). Je zajímavé, že s výjimkou sterolů není role lipidů v laterální organizaci PM dobře pochopena a víme velmi málo i o zapojení kyselých fosfolipidů, navzdory jejich relativní hojnosti v detergent nerozpustných oblastech membrány (Furt et al., 2010). Mechanistické podrobnosti o interakcích, dynamice a vzájemné regulaci mezi membránovými proteiny a jejich mikroprostředí v PM jsou vzácné i pro animální či kvasničné modely a prakticky neznámé v rostlinných buňkách.

Vysoce polarizované rostlinné buňky jako jsou kořenové vlásky či pylové láčky představují obzvláště vhodný modelový systém pro studie membránové organizace, hlavně díky jejich prominentní segregaci proteinů a lipidů v PM dávající vznik funkčně specializovaným doménám. Tyto jsou tvořeny správně vyváženým poměrem procesů exocytózy a endocytózy, endomembránového transportu a dvourozměrné mobility v PM. Tyto buňky jsou navíc velice přístupné pro genetické, molekulární, farmakologické, biochemické, mikroskopické a systémové přístupy.

Molekulární simulace a především molekulární dynamika (MD) se staly nesmírně cenným nástrojem ke studiu systémy membránových a proteinových systémů, hlavně proto že poskytují molekulární rozlišení, které je stále nedostupné prostřednictvím experimentálních přístupů. S nárůstem výpočetních výkonů počítačů a lepších algoritmů dosáhly MD výpočty časů a délek přímo srovnatelných s experimenty a tudíž představují komplementární přístup k experimentálním metodám. Kromě toho umožňují otestovat zvolený systém zájmu na úrovni jedné molekuly (Bennett a Tieleman, 2013). Typické simulované časy pro "all atom" simulace se pohybují do mikrosekund, ale mohou být zvýšeny až na milisekundy pomocí hrubozrnných "coarse-grained" (CG) silových polí, ve kterých jsou skupiny atomů reprezentovány jako jedna částice (Ingolfsson et al., 2016). V posledních 4 letech jsme významně přispěli k ustavení

výzkumu založeného na MD u rostlin (Pleskot et al., 2012; Potocký et al., 2014; Pleskot et al., 2015).

Hlavní otázkou, která bude touto aktivitou uchopena bude: **Jakou roli hrají různé skupiny membránových lipidů v regulaci segregace a laterální mobility proteinů plazmatické membrány?**

Na základě našich předchozích výsledků a recentního vývoje v této vědní oblasti budeme podrobně charakterizovat dynamiku chování plazmatické membrány rostlin. Využijeme multidisciplinárních přístupů s důrazem na použití nejmodernější světelné mikroskopie živých buněk, spektroskopických technik a počítačových simulací pomocí metod molekulární dynamiky. Experimentální část práce bude zaměřená zejména na studium dynamiky fosfolipidů a proteinů v intaktní plazmatické membráně fungující v kontextu živé rostlinné buňky, čehož nelze dosáhnou při studiu této problematiky na arteficiálních membránách.

**Práce bude rozdělena do čtyř vzájemně propojených experimentálních oblastí:**

**Za prvé, vývoj a optimalizace geneticky kódovaných sond pro analýzu laterální mobility fosfolipidů pomocí přístupů kvantitativní mikroskopie živých buněk.** Budeme pokračovat ve vývoji fluorescenčních biomarkerů pro detekci PA (Potocký et al., 2014) a dalších minoritních kyselých fosfolipidů (Simon et al., 2014). Abychom dosáhli vysoce specifické a selektivní vazby sond na cílový lipid, nezbytné pro kvantitativní studie, připravíme konstrukty nesoucí příslušné lipid-vazebné domény v tandemové dupli- nebo triplikaci. Nově navrhne a budeme testovat geneticky kódované markery specifické pro běžné strukturní fosfolipidy, jako je fosfatidylcholin (PC) a fosfatidylethanolamin (PE). Ty budou vycházet z PC-vazebné domény proteinů BSP-A / PDC-109 (Anbazzhagan et al., 2011), respektive z PE-specifického peptidu Maximin H5 (Dennison et al., 2013). Všechny připravené konstrukty budeme testovat v transientně transformovaných buňkách a pro nejlepší optimalizované konstrukty budou připraveny a charakterizovány stabilně transformované linie rostlin *Arabidopsis* a tabáku. Tato část práce bude propojena s VaV centry partnerů SUPRAMOL ÚMCH AV ČR a EEM ÚPT AV ČR s cílem testovat nové nanočástice pro současné zobrazení pomocí fluorescenční a elektronové mikroskopie (Obr. 5.1.1.).

**Za druhé, kvantitativní analýza dynamiky fosfolipidů v rostlinné plazmatické membráně.** Mobilita plasma-membránových fosfolipidů bude hodnocena kombinací pokročilých optických technik, jako jsou Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP), Single-Particle Tracking (SPT) a Raster Image Correlation Spectroscopy (RICS). Kromě fosfolipidových markerů založených na geneticky kódovaných lipid-vazebných doménách fúzovaných s XFP (cíl [i]), využijeme také komerčně dostupné syntetické fosfolipidové fluorescenční analogy. Toto uspořádání nám umožní analyzovat chování jak volné (tj. dostupné pro lipid-vazebnou doménu sondy), tak vázané frakce daného typu fosfolipidů (Kay et al., 2012). Abychom mohli testovat hypotézu o rozdílné laterální heterogenitě kompartmentů plazmatické membrány, provedeme podrobnou analýzu fosfolipidové dynamiky také v liniích *Arabidopsis* a tabáku, exprimujících vybrané fluorescenčně značené plasma-membránové proteiny, u kterých je známá laterální segregace do různých mezoskopických domén, jako PIP2;1, KAT1, NRT1.1, SLAH3 a PIN2 (Jarsch et al, 2014; Kleine-Vehn et al, 2011; Li et al, 2011). Zaměříme se zejména na srovnání odlišných membránových domén (tj domén s lokálně zvýšenou versus sníženou lokalizací daného proteinu).

**Za třetí, výpočetní studie testující vzájemnou souhru polárních fosfolipidů a membránových proteinů.**

Naším cílem bude podrobně zkoumat časoprostorovou dynamiku interakcí fosfolipidů a proteinů v nanoměřítku, s použitím výpočetních MD simulací. Budeme vycházet z dat řešených

v rámci druhé experimentální oblasti a známých trojrozměrných struktur pro proteiny PIP2;1, NRT1.1 a SLAH3 (homologní model). Identifikujeme strukturální vzory lipid-proteinových interakcí a preference pro určitý typ fosfolipidů, které nejsou dostupné přímo z krystalové struktury. Kromě toho budeme analyzovat zejména difúzní charakter jednotlivých komponent membrány s důrazem na testování hypotéz, zda a jak proteiny mění pohyblivost sousedních fosfolipidů a naopak - jak přítomnost konkrétních lipidů ovlivňuje chování proteinů z hlediska mobility a spojování do struktur vyšších řádů.

**Za čtvrté, laterální organizace a dynamika membránových proteinů v buňkách se změněnými hladinami minoritních kyselých fosfolipidů.** Funkční studie rolí vybraných membránových kyselých fosfolipidů na laterální organizaci a dynamiku plazmatické membrány bude testována pomocí transgenických rostlin a buněčných linií se sníženými/zvýšenými hladinami vybraných fosfolipidů v PM (ty budou vybrány na základě výsledků experimentální druhé a třetí experimentální oblasti). Manipulace hladin fosfolipidů bude realizována pomocí lokalizované exprese enzymů, které zvyšují/snižují úroveň specifických fosfolipidů (tj fosfolipáz C a D, lipidových kináz a fosfatáz) na PM. Funkční účinky různých hladin fosfolipidů na heterogenitu PM a segregaci markerových bílkovin (PIN2, PIP2;1 atp.) do mikrodomén budou testovány technikami pokročilé fluorescenční mikroskopie (viz druhá experimentální oblast).

**Milníky: Soubor in vivo dat popisujících dynamiku a interakce membránových lipidů a proteinů.**

**Aktivita 4: Lokalizace a funkční charakterizace složek transkriptomu a proteomu samčího gametofytu**

**Vedoucí aktivity:** Said Hafidh, Ph.D.

Tato aktivita je zaměřena na využití pokročilých mikroskopických technik včetně environmentálního rastrovacího elektronového mikroskopu s vysokým rozlišením partnerského VaV centra EEM ÚPT AV ČR k funkční charakterizaci nově identifikovaných složek transkriptomu a proteomu samčího gametofytu. Hlavní pozornost bude věnována transkriptům a proteinům, jež se podílejí na dynamice cytoskeletu a tvorbě PM a účastní se syntézy buněčné stěny.

**Práce bude rozdělena do dvou experimentálních oblastí:**

**Za prvé, role transportu mRNA a lokalizace translačního aparátu při tvorbě a udržování buněčné polarity v asymetricky rostoucích rostlinných buňkách bude studována.** Budeme využívat stávajícího -omického a pokročilého mikroskopického technologického zázemí, jež je k dispozici pro Arabidopsis a tabák jako modelové druhy pro identifikaci a charakterizaci úlohy transportu mRNA a lokalizace translačního aparátu v rostoucích pylových láčkách a při dvojitém oplození. Transkriptomika, translatomika a sekvestromika v návaznosti na subcelulární frakcionaci transkriptů podle jejich translačního stavu budou použity k identifikaci transkriptů s diskontinuálními expresními profily. Budou popsány a charakterizovány jak známé asymetricky distribuované transkripty (souvisejících s transportem podél CSK a asociovaných s membránou a) tak nově identifikované kandidátní mRNA. Tyto nově identifikované transkripty doplní již známé translačně reprimované mRNA, zahrnující např. protein buněčné stěny NTP303 (Honys et al. 2000, Honys et al., 2009) a jeho ortolog NTP805, dále TUA6 (tubulin  $\alpha$ -6-chain), FAD2 (fatty- acid desaturase 2), AHA9 (plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase 9), AtFH5 (formin homology 5), AVP1 (vacuolar- type H<sup>+</sup>-pumping pyrophosphatase 1, possibly auxin-related) a PUP11 (purine permease 11 transmembrane transporter; Hafidh et

al., nepublikováno). Identita translačně neaktivních transkriptů bude ověřena pomocí pokročilých sekvenačních technik.

Diskontinuálně exprimované transkripty a s nimi asociované RNA-vazebné proteiny budou popsány a dynamika jejich lokalizace bude studována pomocí fluorescenční a elektronové mikroskopie ve spolupráci s partnery v SUPRAMOL ÚMCH AV ČR a EEM ÚPT AV ČR (Obr. 5.1.1) s využitím dvousložkového systému RNA vizualizace založeném na vazbě k fágovému proteinu  $\lambda$ N22 (Schönberger et al 2012) a F-WISH (whole-mount RNA in situ hybridization; Bleckmann et al 2015). Bude sledována dynamika lokalizace zkoumaných transkriptů a jejich kolokalizace s řadou subcelulárních markerů ve vztahu k jejich translačnímu stavu během růstu pylové láčky. Regulační mechanismy translačního umlčování mRNA a její lokalizace budou charakterizovány pomocí identifikace RNA-vazebných proteinů a dalších proteinů obsažených v EPP granulích (Honys et al., 2009). Za tímto účelem budou RNA-vazebné proteiny separovány pomocí afinitních ligandů (angl. RNA pull-down assay), imunoprecipitací a pomocí kvasinkového trojhybridního systému (angl. Y3H screen). RNA-vazebné proteiny budou identifikovány metodami hmotnostní spektroskopie (LC-MS/MS), které nám také umožní popsat dynamiku jejich post-translačních modifikací.

Vybrané geny a jimi kódované proteiny budou charakterizovány z funkčního i regulačního hlediska. Pro funkční charakterizaci využijeme dostupného fenotypizačního zázemí pro studium mutantů (Reňák et al., 2012). Genově specifické mutanty budou buď objednány jako T-DNA linie či pravděpodobněji budou vytvořeny pomocí zavedené strategie robustního umlčování mRNA obecně a tkáňově-specificky exprimovanými amiRNA. Dále ověříme účinek ektopické overexprese zkoumaných genů a dynamiku subcelulární lokalizace analyzovaných fúzních proteinů. Budeme také zkoumat regulační úlohu příslušných sekvenčních motivů RNA při regulaci lokalizace RNA, translačního stavu a schopnosti vázat proteiny. Za tímto účelem budeme analyzovat jejich 5' a 3' nepřekládané oblasti a eventuálně i kódující oblast, vazebné proteiny a využijeme i RNA editační mutanty.

**Za druhé, bude objasněna úloha dočasných receptorů připojených k membráně prostřednictvím GPI-kotvy při interakcích pylové láčky s pestíkem.** Pomocí kombinace mikroskopických technik včetně FRET a BiFC spolu s imunoprecipitací budeme schopni stanovit interakční moduly ligand-receptor účastníci se vedení pylové láčky pestíkem před oplozením. Specificky se zaměříme na úlohu GPI-kotvených proteinů lokalizovaných na povrchu plazmatické membrány pylové láčky. Již dříve jsme popsali, že 14% sekretomu pylových láček rostoucích pletivy pestíku je tvořeno GPI-kotvenými proteiny (Hafidh et al., 2016). Pro izolaci a obohacení o GPI-ukotvené buněčné povrchové receptory budou pylové láčky nejprve kultivovány *semi-in vivo* po dobu 24 h (Hafidh et al., 2014, Hafidh et al., 2016). Pylové láčky budou před izolací sekretomu ošetřeny rekombinantní Pi-fosfolipázou C (PI-PLC) a sekretované proteiny budou koncentrovány ultrafiltrací. Vazba popsaných GPI-ukotvených kandidátních proteinů s jejich potenciálními ligandy bude demonstrována *in planta* pomocí rekonstituce rozděleného YFP (BiFC). Souběžně bude afinitní purifikace TRICEPS využita k označení ligandů a testování membránových receptorů pylové láčky. Afinita a entalpie interakcí bude kvantifikována pomocí dvou biofyzikálních přístupů, MST (microscale thermophoresis) a ITC (isothermal titration calorimetry).

**Milníky: Soubor *in vivo* dat popisujících lokalizaci a dynamiku konkrétních složek transkriptomu a proteomu samčího gametofytu.**



V rámci výzkumného cíle je plánováno publikovat výsledky v impaktovaných vědeckých časopisech a naplnit tak indikátory 2 02 11 a 2 02 16 v počtu 25 ks 2 02 11 a 25 ks 2 02 16. Poměr (indikátor 2 02 14) bude 50%.

## ***Výzkumný cíl 2: Identifikace složení buněčných povrchů a mezibuněčných prostor u rostlin***

Jak bylo zmíněno v obecném úvodu tohoto výzkumného programu, buněčná stěna se podílí významně na stavbě rostlinného těla. Kromě formování samotné struktury rostlinného těla hraje buněčná stěna zásadní význam v pokožkových buňkách. Nadzemní části rostlin jsou kryté pokožkovými buňkami, které na povrch deponují specifické látky, polymery hydrofóbního charakteru. Jejich hlavní úlohou je zamezit ztrátám vody z buněk, zamezit průniku nežádoucích látek a také průniku patogenů do rostlinného těla. Tato specializovaná struktura se nazývá kutikula (Yeats a Rose, 2013). Kutikula je u většiny rostlin tvořena polymerem kutinem v kombinaci s vosky. Kromě hydrofóbního charakteru kutikuly hraje v životě rostlin roli i samotná mikro- až nanostruktura povrchu kutikuly, která je utvářena díky epikutikulární vrstvě vosků, formujících se v krystalové struktury na povrchu rostlin. Tato struktura umocňuje vlastnosti kutikuly v zamezení ztrát vody, přináší samočisticí schopnosti rostlinným povrchům, a významně ovlivňuje odrazivost rostlinných povrchů (Koch and Barthlott, 2009). Výčet vlastností naznačuje význam rostlinné buněčné stěny a specializované buněčné stěny povrchů pro rostliny samotné. Ukazuje však také cesty využití těchto vlastností v průmyslu (samočisticí povrchy) či dalších odvětvích, jako je např. dálkový průzkum země a monitorování kvality a složení rostlinných společenstev (odrazivost v závislosti na rostlinném druhu či jeho fyziologickém stavu). Navíc se ukazuje, že komplexní struktura extracelulárního materiálu, může rozhodovat o časném vývoji rostlinných embryí, což naznačuje přenos signálu mezi extra a intracelulárním prostředím. Ačkoliv jak skenovací tak fluorescenční mikroskopie poskytly důležitá data o složení povrchových struktur a mezibuněčných prostor, je stále velký nedostatek metod a instrumentace optimalizovaných pro neinvazivní zobrazování ve vysokém detailu napojených na prvkovou analýzu, stejně tak jako označení těchto struktur nanočásticemi. Tato výzva je předmětem tohoto výzkumného cíle, který bude experimentálně prováděn navrhovatelským VaV centrem se třemi partnerskými VaV centry (Obr. 5.1.1). Celkem 3 výzkumné aktivity jsou tyto: 1) Charakterizace role cytoskeletu při syntéze buněčné stěny rostlin 2) Identifikace úlohy extracelulárního materiálu během rostlinné embryogeneze a 3) Identifikace struktur buněčných povrchů, které určují listovou odrazivost.

### ***Aktivita 1: Charakterizace role cytoskeletu při syntéze buněčné stěny rostlin***

***Vedoucí aktivity:*** RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Téma syntézy buněčné stěny a kontroly její kvality je pochopitelně předmětem intenzivního výzkumu. V posledních letech bylo učiněno mnoho významných objevů především na poli syntézy celulózy. Je však pravdou, že studium buněčné stěny, složité kompozitní extracelulární struktury skládající se z karbohydrátových, lipidických a fenolových polymerů, je stále velikou experimentální výzvou. Je známo, že celulóza je syntetizována multienzymovými membránovými komplexy (Kumar a Turner 2015). Jejich pohyb je kontrolován mikrotubuly (Paredes et al. 2006). Syntéza ostatních karbohydrátových složek probíhá v buněčných organelách Golgiho aparát a do prostoru buněčné stěny jsou dopravovány pomocí váčků a další složky cytoskeletu, aktinových filament. Syntéza kutinu a vosků probíhá v organele endoplazmatické retikulum, ale způsob dopravy těchto hydrofóbních látek do prostoru

buněčné stěny či na její povrch v případě pokožkových buněk je velmi málo prozkoumán (Domínguez et al. 2015, Lee a Suh 2015). Jakékoliv pokroky v porozumění syntézy a funkce rostlinných buněčných stěn a jejich modifikací představuje potenciálně významný výsledek využitelný nejen v rostlinné biologii, ale i v průmyslu či dalších odvětvích.

**Tato aktivita se skládá ze tří hlavních oblastí.**

**Za prvé, nové faktory a mechanismy účastníci se syntézy buněčné stěny u rostlin budou identifikovány.** Tato práce je založena na zkušenostech naší laboratoře s identifikací mechanismů vnitrobuněčného transportu pomocí cytoskeletu a syntézy buněčné stěny. Syntéza buněčné stěny je komplexním procesem, který zahrnuje jak vnitrobuněčný transport závislý na aktinu, tak umístění celulóza syntázových komplexů pomocí mikrotubulů (Sampathkumar et al., 2013; Yanagisawa et al., 2015). V naší předchozí práci jsme navrhli několik "míst setkání" pro interakce aktinového a mikrotubulárního cytoskeletu (Petrášek a Schwarzerová, 2009; Šlajcherová et al., 2012; Krtková et al., 2016) a některé z nich jsou nyní zkoumány v naší laboratoři. Tyto zahrnují spojení mezi aktin nukleačním komplexem Arp2/3 a mikrotubuly (Havelková et al., 2015) a nově odhalená role tohoto komplexu při syntéze buněčné stěny (Sahi et al., v přípravě). Neinvazivní pozorování Arp2/3 mutantních rostlin v laboratoři partnerského VaV centra EEM ÚPT AVČR pomocí environmentální rastrovací (skenovací) elektronové mikroskopie (EREM) již prokázalo změny v povrchovém složení jejich kutikuly a buněčné stěny. V této aktivitě budeme pomocí EREM studovat vlastnosti buněčné stěny rostlin *Arabidopsis* v rostlinách se změněnou strukturou buněčné stěny. V současné době neexistuje jiná technika, která by umožnila zobrazovat rostlinné povrchy v nativním stavu ve vysokém rozlišení. Všechny dosavadní techniky včetně SEM vyžadují fixaci a úpravu vzorku. Tyto procesy však významně mění, až přímo degradují lipidické složky kutikuly a epikutikulárních vosků. EREM v kombinaci s kvalitativní analýzou či mikromanipulací má obrovský potenciál ve výzkumu nativních povrchů rostlin, buněčných stěn a jejich vlastností. Vysoké rozlišení této mikroskopické metody umožní studium mikro- až nanostruktur jak na povrchu buněčné stěny (mikro- a nanokrystaly vosků), tak přímo i v buněčných stěnách (mikrofibrily celulózy či další polymerní složky). Hlavním experimentálním materiálem budou mutantní rostliny vykazující poruchy v některých cytoplazmatických drahách, které by se mohly účastnit syntézy buněčné stěny či některé její složky. V experimentech budou charakterizovány změny ve struktuře buněčné stěny, které budou přiřazeny k dané signální dráze pomocí zavedených metod biochemie a molekulární biologie, tj. pomocí analýz obnovy mutantního fenotypu, stanovením lipidového a sacharidového složení BS a vizualizací celulóza syntázových komplexů, přenašečů ligninu a dalších složek stěny pomocí fluorescenční mikroskopie. Protilátky vytvořené v naší laboratoři proti aktin složkám aktin nukleačního komplexu (Havelková et al., 2015) budou využity v kombinaci se sekundárními protilátkami označenými nanočásticemi ve spolupráci s VaV centrem partnera SUPRAMOL ÚMCH AV ČR. Postižení tvorby buněčné stěny u mutant se projevuje i celkově změněnou pevností dospělé rostliny, proto budou celistvé rostliny studovány i magnetickou rezonanční technikou (MRI) na partnerském VaV centru IKEM (Fig. 5.1.1).

**Za druhé, budou studovány rostlinné povrchy pro pochopení jejich významu při průniku patogenů do buněk.** Bude studován vztah mezi vývojem kutikuly a vosků na listech jabloně a infekcí patogenem *Venturia inaequalis*. Na infekci touto houbovou chorobou jsou citlivé nejmladší vyvíjející se listy, zatímco starší listy vykazují vysokou rezistenci. V předběžných experimentech bylo zjištěno, že kutikula epidermálních buněk listů jabloně má specifické uspořádání, které se mění během ontogeneze listu. Cílem je ověřit teorii, že mladé listy mají jiné uspořádání povrchových struktur než starší listy, a že tento fakt hraje roli v průniku

patogena. Stejně jako v předchozí části této aktivity bude využit EREM kombinovaný s molekulárně biologickými metodami s cílem identifikovat procesy závislé na cytoskeletu, které rozhodují o recyklaci membrán, vnitrobuněčném transportu a syntéze buněčné stěny.

**Za třetí, bude studována syntéza nově identifikované struktury na bázi rostlinných trichomů.** Další typy buněk s komplexním tvarem, který se též odráží v komplikované biosyntéze jejich buněčných stěn, jsou trichomy, emergence na povrchu listů. Jak jsme ukázali sekundární BS trichomů u *Arabidopsis* v sobě akumuluje kovy jako je např. zinek, měď či kadmium a tyto prvky jsou též přítomny v nově popsané struktuře BS, bohaté na kalózu, na bázi trichomů (Kulich et al. 2015). Též jsme ukázali, že depozice materiálu do této oblasti BS je závislá na směrované exocytóze. Ve spolupráci s partnerským VaV centrem EEM ÚPT AVČR (Fig. 5.1.1.) bude pomocí elektronové mikroskopie spojené s prvkovým analyzátozem analyzováno složení BS trichomů. Též budou takto pozorovány nanočástice  $\text{TiO}_2$ , které jsme též v předběžných experimentech lokalizovali v BS trichomů po jejich přidavku do substrátu. Cílem bude odhalit mechanismus jejich příjmu a depozice v rostlině. K odlišení, zdali se nanočástice  $\text{TiO}_2$  vstřebávají přímo anebo nejprve tvoří komplexy v rhizosféře a takto jsou absorbovány, bude připraven polymerní gel s rozptýlenými  $\text{TiO}_2$  nanočásticemi ve spolupráci s partnerským VaV centrem SUPRAMOL ÚMCH AV ČR (Fig. 5.1.1) a rostliny kultivovány v tomto gelu. Nízkomolekulární komplexy Ti (tzn. rozpuštěné  $\text{TiO}_2$  nanočástice) volně difundují skrz gel, zatímco  $\text{TiO}_2$  částice jsou zachyceny. Opačný postup bude proveden při kultivaci rostlin v živném roztoku typu Hoagland s obsahem makroporézní pryskyřice (typu 8-HQ), která naopak vyváže rozpuštěné nanočástice  $\text{TiO}_2$ . Tato kombinace technik umožní odlišit, v jaké formě jsou nanočástice přijímány. Protože tyto výsledky mohou být zobecněny také na další nanočástice, má tento výzkum velmi slibné vyhlídky na možné aplikace v oblasti nanotechnologií u rostlin. Navíc, díky podobnosti ve složení buněčné stěny trichomů *Arabidopsis* a bavlníku mohou naše výsledky přispět k postupům využívajícím nanotechnologií k vylepšení textilní bavlny.

**Milníky: Soubor dat charakterizujících roli cytoskeletu a asociovaných proteinů při syntéze buněčné stěny a buněčných povrchů**

### **Aktivita 2: Identifikace úlohy extracelulárního materiálu během rostlinné embryogeneze**

**Vedoucí aktivity: Mgr. Kateřina Eliášová, Ph.D.**

Jednotlivé fáze somatické embryogeneze jehličnanů jsou dlouhodobě v naší laboratoři studovány na biochemické a histologické úrovni. Hladiny endogenních fytohormonů, polyaminů, fenolických látek a cukrů a akumulace zásobních látek rozhodují o průběhu těchto fází (Gemperlová et al., 2009), ale porozumění kooperace vnitrobuněčných struktur při procesu somatické embryogeneze je stále jen částečné. Naše předchozí studie ukázali, jak spolupracují jednotlivé aktinové isoformy během jednotlivých fází somatické embryogeneze, během které jsou specifické isoformy exprimovány jen v buňkách suspensoru a snižují expresi během maturační fáze (Schwarzerová et al., 2010; Vondráková et al., 2014).

**Za první se soustředíme na změny ve struktuře cytoskeletu v suspensorových a meristemických buňkách** během dozrávání embryí s ohledem na možnou roli cytoskeletu v syntéze buněčné stěny tvorby extracelulárního materiálu. Chceme získat zejména informaci o propojení suspensorových a meristemických buněk v raném embryu a o významu suspensorových buněk na počátku zrání, včetně procesu postupného rozpadu suspensoru. **Za druhé se soustředíme na změny indukované abiotickým stresem** (Cvikrová et al., 2016; Eliášová et al., 2016) na povrchu mladých somatických embryí smrku. V obou těchto oblastech budou povrchové struktury embryí studovány *in vivo*, tj. bez jakékoliv fixace materiálu. Využití environmentálního rastrovacího mikroskopu (AQUASEM II) na pracovišti VaV centra EEM ÚPT

AVČR (Obr. 5.1.1.) nám umožní studovat embryogenní kultury téměř v nativním stavu a významně tak doplnit naše dosavadní znalosti o poznatky, které nelze jiným způsobem získat. Tato technika již byla použita pro neinvazivní pozorování rostlinných buněk (Zheng et al., 2009; Stabentheiner et al., 2010; McGregor et al., 2013). Jak plyne z našich předběžných pozorování a z výsledků partnerské laboratoře EEM ÚPT AVČR (Neděla et al., 2016), jsou v raných stádiích vývoje pokrytá somatická embrya vrstvou extracelulárního materiálu, někdy nazývaného „extracelulární matrix“. Tato vrstva je patrně komplexem pektinových polysacharidů, proteinů a lipofilních substancí. Naším dalším cílem je proto charakterizovat stav „extracelulární matrix“, pokrývající raná embrya a změny, kterými prochází na počátku jejich zrání.

**Milníky: Soubor funkčních dat charakterizujících roli extracelulárního materiálu pro průběh somatické embryogeneze u rostlin.**

### **Aktivita 3: Pochopit jak ovlivňuje povrchová struktura listu jeho odrazivost**

**Klíčová osoba:** Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

Optické vlastnosti listu (reflektance, absorpce, transmitance) ve viditelné oblasti spektra (400-700 nm) jsou ovlivněny biochemickým složením listu, a to především fotosyntetickými pigmenty. V oblasti blízkého infračerveného záření (700-2300 nm; NIR Near Infrared) lze z optických vlastností listu usuzovat o jeho biochemickém složení (lignin, celulóza), obsahu vody a jeho vnitřní struktury. Studie zaměřené na vztah mezi strukturou listu a reflektancí jsou spíše ojedinělé, např. práce zaměřená na vztah povrchové struktury s reflektancí převážně ve viditelném spektru (Buschman et al. 2012). Vztah struktury a biochemického složení listu a jeho optických vlastností má návaznost na dálkový průzkum země, sledování fyziologického stavu a fenologie rostlin pomocí hyperspektrálních dat (Mišurec et al. 2012).

V rámci této aktivity chceme studovat, jakým způsobem povrchová a vnitřní struktura listů s různou mírou xeromorfní adaptace ovlivňuje jejich odrazivost v NIR. Odrazivost listu je využívána v metodách dálkového průzkumu Země (DPZ) **pro determinaci fyziologického stavu porostů rostlin**. Pro využití v DPZ a modelování vlastností vegetace velkoplošně s použitím hyperspektrálních dat tyto parametry vstupují do modelů radioaktivního transferu na úrovni listu (PROSPECT, LIBERTY). Nově bude využit model DLM (Dorsiventral Leaf radiative transfer Model; Stuckens et al. 2009) pro „upscaling“ dat na vyšší úrovni. Výhodou DLM modelu je zohlednění asymetrie v rozložení fotosyntetických pigmentů, sušiny a vody v dorziventrálním listu a dosud není jasné, do jaké míry tato asymetrie hraje roli při přenesení na úroveň koruny.

Anatomické parametry listu jsou pro účel vstupu do modelů radiativního transferu vyjadřovány kvantitativně, k čemuž slouží např. stereologické metody aplikovatelné na data ze světelné, konfokální i elektronové mikroskopie (Albrechtová et al. 2007, Lhotáková et al. 2008, Kubínová et al. 2014).

Optické vlastnosti listu budou měřeny pomocí spektrometru (FieldSpec 4-ASD) s kontaktní sondou nebo integrační sférou. Současná literatura neuvádí podrobnou studii vztahu reflektance v NIR a povrchovou strukturou listu. Posunem v dané problematice bude simultánní měření odrazivosti i v NIR a anatomické struktury pomocí environmentální elektronové mikroskopie, která bude prováděna ve spolupráci s partnerským pracovištěm EEM ÚPT AV ČR (Obr. 5.1.1).

**Milníky: Spektrální knihovna listů odlišné anatomické struktury s různými xeromorfními adaptacemi.**

V rámci výzkumného cíle je plánováno publikovat výsledky v impaktovaných vědeckých časopisech a naplnit tak indikátory 2 02 11 a 2 02 16 v počtu 10 ks 2 02 11 a 10 ks 2 02 16. Poměr (indikátor 2 02 14) bude 50%.

### Seznam literatury zmiňované v kapitolách 5.1.2 a 5.1.3:

- Albrechtová J, Janáček J, Lhotáková Z, Radochová B, Kubínová L (2007): Novel efficient methods for measuring mesophyll anatomical characteristics from fresh thick sections using stereology and confocal microscopy: application on acid rain treated Norway spruce needles. *Journal of Experimental Botany* 58 (6):1451-1461.
- Ambrose, C., Ruan, Y., Gardiner, J., Tamblyn, L.M., Catching, A., Kirik, V., Marc, J., Overall, R., and Wasteneys, G.O. (2013). CLASP interacts with sorting nexin 1 to link microtubules and auxin transport via PIN2 recycling in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Cell* 24: 649–59.
- Anbazhagan, V., Sankhala, R.S., Singh, B.P., and Swamy, M.J. (2011). Isothermal Titration Calorimetric Studies on the Interaction of the Major Bovine Seminal Plasma Protein, PDC-109 with Phospholipid Membranes. *PLOS ONE* 6: e25993.
- Armengot, L., Marquès-Bueno, M.M., and Jaillais, Y. (2016). Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases. *J. Exp. Bot.*: erw216. doi:10.1093/jxb/erw216
- Barton, D.A., Vantard, M., and Overall, R.L. (2008). Analysis of cortical arrays from *Tradescantia virginiana* at high resolution reveals discrete microtubule subpopulations and demonstrates that confocal images of arrays can be misleading. *Plant Cell* 20: 982–94.
- Brandizzi, F. and Wasteneys, G.O. (2013). Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. *Plant J.* 75: 339–49.
- Bennett, W.F.D. and Tieleman, D.P. (2013). Computer simulations of lipid membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828: 1765–1776.
- Bleckmann, A. and Dresselhaus, T. (2016). Fluorescent whole-mount RNA in situ hybridization (F-WISH) in plant germ cells and the fertilized ovule. *Methods* 98: 66–73.
- Buschmann, C., Lenk, S., and Lichtenthaler, H.K. (2012). Reflectance spectra and images of green leaves with different tissue structure and chlorophyll content. *Israel Journal of Plant Sciences* 60, 49–64.
- Chen, X. and Friml, J. (2014). Rho-GTPase-regulated vesicle trafficking in plant cell polarity. *Biochem. Soc. Trans.* 42: 212–218.
- Cvikrová M, Vondráková Z, Eliášová K, Pešek B, Trávníčková A, Vágner M. (2016) The impact of UV-B irradiation applied at different phases of somatic embryo development in Norway spruce on polyamine metabolism. *Trees* 30, 113-124.
- Dennison, S.R., Harris, F., Mura, M., Morton, L.H.G., Zvelindovsky, A., and Phoenix, D.A. (2013). A Novel Form of Bacterial Resistance to the Action of Eukaryotic Host Defense Peptides, the Use of a Lipid Receptor. *Biochemistry* 52: 6021–6029.
- Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A (2015) Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends in Plant Science* 20(9) 551-558
- Drdová, E.J., Synek, L., Pečenková, T., Hála, M., Kulich, I., Fowler, J.E., Murphy, A.S., and Zárský, V. (2013). The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant J.* 73: 709–19.
- Eliášová K, Vondráková Z, Malbeck J, Trávníčková A, Pešek B, Vágner M, Cvikrová M. (2016) Histological and biochemical response of Norway spruce somatic embryos to UV-B irradiation (submitted)
- Fan, L., Li, R., Pan, J., Ding, Z., and Lin, J. (2015). Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci.*: 1–10.
- Feraru, E., Feraru, M.I., Kleine-Vehn, J., Martinière, A., Mouille, G., Vanneste, S., Vernhettes, S., Runions, J., and Friml, J. (2011). PIN polarity maintenance by the cell wall in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 21: 338–343.
- Fišerová, J. and Goldberg, M.W. (2014). Imaging Plant Nuclei and Membrane-Associated Cytoskeleton by Field Emission Scanning Electron Microscopy. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), pp. 171–181.
- Furt, F., Konig, S., Bessoule, J.J., Sargueil, F., Zallot, R., Stanislas, T., Noirot, E., Lherminier, J., Simon-Plas, F., Heilmann, I., and Mongrand, S. (2010). Polyphosphoinositides Are Enriched in Plant Membrane Rafts and Form Microdomains in the Plasma Membrane. *PLANT PHYSIOLOGY* 152: 2173–2187.
- Gemperlová L, Fischerová L, Cvikrová M, Malá J, Vondráková Z, Martincová O, Vágner M. (2009) Polyamine profiles and biosynthesis in somatic embryo development and comparison of germinating somatic and zygotic embryos of Norway spruce. *Tree Physiology* 29, 1287-1298.
- Goldberg, M.W. and Fiserova, J. (2010). Immunogold labelling for scanning electron microscopy. *Methods Mol. Biol.* 657: 297–313.
- Habets, M.E.J. and Offringa, R. (2014). Tansley review PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity : a key target for environmental and endogenous signals.
- Hafidh S, Potesil D, Fila J, Capkova V, Zdrahal Z, Honys D (2016) Quantitative proteomics of the tobacco pollen tube secretome identifies novel pollen tube guidance proteins important for fertilization. *Genome Biol* 17 (1):81.

- Hafidh S, Potěšil D, Fíla J, Feciková J, Čapková V, Zdráhal Z, Honys D (2014) In search of ligands and receptors of the pollen tube: the missing link in pollen tube perception. *Biochem Soc Trans* 42 (2):388-394.
- Havelková, L., Nanda, G., Martinek, J., Bellinvia, E., Sikorová, L., Šlajcherová, K., Seifertová, D., Fischer, L., Fišerová, J., Petrášek, J., and Schwarzerová, K. (2015). Arp2/3 complex subunit ARPC2 binds to microtubules. *Plant Sci.* 241: 96–108.
- Henty-Ridilla, J.L., Li, J., Blanchoin, L., and Staiger, C.J. (2013). Actin dynamics in the cortical array of plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 678–87.
- Honys D, Combe JP, Twell D, Čapková V (2000) The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. *Sexual Plant Reproduction* 13 (3):135-144
- Honys D, Reňák D, Feciková J, Jedelský PL, Nebesářová J, Dobrev P, Čapková V (2009) Cytoskeleton-associated large RNP complexes in tobacco male gametophyte (EPPs) are associated with ribosomes and are involved in protein synthesis, processing, and localization. *J Proteome Res* 8 (4):2015-2031.
- Ingolfsson, H.I., Arnarez, C., Periole, X., and Marrink, S.J. (2016). Computational 'microscopy of cellular membranes. *Journal of Cell Science* 129: 257–268.
- Jarsch, I.K., Konrad, S.S.A., Stratil, T.F., Urbanus, S.L., Szymanski, W., Braun, P., Braun, K.-H., and Ott, T. (2014). Plasma Membranes Are Subcompartmentalized into a Plethora of Coexisting and Diverse Microdomains in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* 26: 1698–1711.
- Jelínková, A., Müller, K., Fílová-Pařezová, M., Petrášek, J.: NtGNL1a ARF-GEF acts in endocytosis in tobacco cells. *BMC Plant Biology* 15, 272, 2015.
- Kay, J.G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T., and Grinstein, S. (2012). Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol. Biol. Cell* 23: 2198–2212.
- Kleine-Vehn, J. et al. (2011). Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol. Syst. Biol.* 7: 540.
- Koch K, Barthlott B (2009) Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 367:1487-1509
- Konrad, S.S.A., and Ott, T. (2015). Molecular principles of membrane microdomain targeting in plants. *Trends Plant Sci.* 20:351-361.
- Krčková Z, Brouzdová J, Daněk M, Kocourková D, Rainteau D, Ruelland E, Valentova O, Pejchar P, Martinek J (2015) *Arabidopsis* non-specific phospholipase C1: Characterisation and its involvement in response to heat stress. *Front Plant Sci* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00928
- Krtková J, Benáková M, Schwarzerová K (2016) Multifunctional Microtubule-Associated Proteins in Plants. *Front Plant Sci.* 7:474
- Krtková J, Havelková L, Křepelová A, Fišer R, Vosolsobě S, Novotná Z, Martinek J, Schwarzerová K (2012a) Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 60:88-97.
- Krtková, J., Zimmermann, A., Schwarzerová, K., and Nick, P. (2012b). Hsp90 binds microtubules and is involved in the reorganization of the microtubular network in angiosperms. *J. Plant Physiol.* 169: 1329–39.
- Kubínová, Z; Janáček, J; Lhotáková, Z; Kubínová, L; Albrechtová, J (2014) Unbiased estimation of chloroplast number in mesophyll cells: advantage of a genuine three-dimensional approach. *Journal of Experimental Botany* 65, 2: 609-620. DOI: 10.1093/jxb/ert407
- Kulich I, Vojtíková Z, Glanc M, Ortmannová J, Rasmann S, Žárský V. Cell wall maturation of *Arabidopsis* trichomes is dependent on exocyst subunit EXO70H4 and involves callose deposition. *Plant Physiol.* 2015 May;168(1):120-31
- Kumar M, Turner S (2015): Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms. *Phytochemistry* 112 91-99
- Laňková, M., Humpolíčková, J., Vosolsobě, S., Cit, Z., Lacek, J., Čovan, M., Čovanová, M., Hof, M., Petrášek, J.: Determination of dynamics of plant plasma membrane proteins with fluorescence recovery and raster image correlation spectroscopy. *Microscopy and Microanalysis* 22, 290-299, 2016.
- Lee SB, Suh MC (2015) Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species. *Plant Cell Reports* 34:557-572
- Leitner, J., Petrášek, J., Tomanov, K., Retzer, K., Pařezová, M., Korbei, B., Bachmair, A., Zažímalová, E., Luschnig, C.: Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier governs hormonally controlled adaptation in *Arabidopsis* root growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 8322-8327, 2012.
- Lhotáková, Z; Albrechtová, J; Janáček, J; Kubínová, L (2008): Advantages and pitfalls of using free-hand sections of frozen needles for three-dimensional analysis of mesophyll by stereology and confocal microscopy. *Journal of Microscopy* 232: 56-63, DOI: 10.1111/j.1365-2818.2008.02079.x

- Li, X., Wang, X., Yang, Y., Li, R., He, Q., Fang, X., Luu, D.-T., Maurel, C., and Lin, J. (2011). Single-Molecule Analysis of PIP<sub>2</sub>;1 Dynamics and Partitioning Reveals Multiple Modes of Arabidopsis Plasma Membrane Aquaporin Regulation. *Plant Cell* 23: 3780–3797.
- Luschnig, C. and Vert, G. (2014). The dynamics of plant plasma membrane proteins: PINs and beyond. *Development* 141: 2924–38.
- Malínský, J., Opekarová, M., Grossmann, G., and Tanner, W. (2013). Membrane Microdomains, Rafts, and Detergent-Resistant Membranes in Plants and Fungi. *Annual Review of Plant Biology* 64: 501–529.
- Martinieri, A. et al. (2012). Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 12805–12810.
- Matoušková J, Janda M, Fišer R, Šašek V, Kocourková D, Burketová L, Dušková J, Martinec J, Valentová O (2014) Changes in actin dynamics are involved in salicylic acid signaling pathway. *Plant Sci* 223:36-44. doi:10.1016/j.plantsci.2014.03.002
- McGregor, J.E., Staniewicz, L.T.L., Guthrie Neé Kirk, S.E., and Donald, A.M. (2013). Environmental scanning electron microscopy in cell biology. *Methods Mol. Biol.* 931: 493–516.
- Men, S., Boutté, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y.-D., Hartmann, M.-A., Moritz, T., and Grebe, M. (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.* 10: 237–244.
- Mišurec, J., Kopačková, V., Lhotáková, Z., Hanuš, J., Weyermann, J., Entcheva-Campbell, P., & Albrechtová, J. (2012). Utilization of hyperspectral image optical indices to assess the Norway spruce forest health status. *Journal of Applied Remote Sensing*, 6(1), 063545-1.
- Mravec, J. et al. (2011). Cell plate restricted association of DRP1A and PIN proteins is required for cell polarity establishment in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 21: 1055–60.
- Neděla, V., Hřib, J., Havel, L., Hudec, J., and Runštuk, J. (2016). Imaging of Norway spruce early somatic embryos with the ESEM, Cryo-SEM and laser scanning microscope. *Micron* 84: 67–71.
- Offringa, R. and Huang, F. (2013). Phosphorylation-dependent trafficking of plasma membrane proteins in animal and plant cells. *J. Integr. Plant Biol.* 55: 789–808.
- Paredes AR, Somerville CR, Erhardt DW (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312(5779):1491-1495
- Petrášek, J. and Schwarzerová, K. (2009). Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 728–34.
- Petrášek, J. and Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675–88.
- Pejchar P, Potocký M, Krčková Z, Brouzdová J, Daněk M, Martinec J (2015) Non-specific phospholipase C4 mediates response to aluminum toxicity in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* 6:66.
- Pleskot, R., Cwiklik, L., Jungwirth, P., Žárský, V., and Potocký, M. (2015). Membrane targeting of the yeast exocyst complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848: 1481–1489.
- Pleskot, R., Pejchar, P., Žárský, V., Staiger, C.J., and Potocký, M. (2012). Structural Insights into the Inhibition of Actin-Capping Protein by Interactions with Phosphatidic Acid and Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate. *PLoS Computational Biology* 8: e1002765.
- Potocký, M., Pleskot, R., Pejchar, P., Vitale, N., Kost, B., and Žárský, V. (2014). Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derived biosensor. *New Phytologist* 203: 483–494.
- Qi, Y., Tsuda, K., Nguyen, L. V., Wang, X., Lin, J., Murphy, A.S., Glazebrook, J., Thordal-Christensen, H., and Katagiri, F. (2011). Physical association of Arabidopsis Hypersensitive Induced Reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. *J. Biol. Chem.* 286: 31297–31307.
- Richter, S., Voss, U., and Jürgens, G. (2009). Post-Golgi traffic in plants. *Traffic* 10: 819–28.
- Reňák D, Dupl'áková N, Honys D (2012) Wide-scale screening of T-DNA lines for transcription factor genes affecting male gametophyte development in Arabidopsis. *Sexual Plant Reproduction* 25 (1):39-60.
- Rosso, F., Papale, F., and Barbarisi, A. (2013). Environmental scanning electron microscopy gold immunolabeling in cell biology. *Methods Mol. Biol.* 931: 517–23.
- Sampathkumar A, Gutierrez R, McFarlane HE, Bringmann M, Lindeboom J, Emons AM, Samuels L, Ketelaar T, Ehrhardt DW, Persson S (2013) Patterning and lifetime of plasma membrane- localized cellulose synthase is dependent on actin organization in Arabidopsis interphase cells. *Plant Physiol* 162: 675-688
- Sekereš, J., Pleskot, R., Pejchar, P., Žárský, V., and Potocký, M. (2015). The song of lipids and proteins: dynamic lipid-protein interfaces in the regulation of plant cell polarity at different scales. *Journal of Experimental Botany* 66: 1587–1598.
- Simon, M.L.A., Platre, M.P., Assil, S., van Wijk, R., Chen, W.Y., Chory, J., Dreux, M., Munnik, T., and Jaillais, Y. (2014). A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in Arabidopsis. *The Plant Journal* 77: 322–337.

- Schonberger J, Hammes UZ, Dresselhaus T (2012) In vivo visualization of RNA in plants cells using the lambdaN(2)(2) system and a GATEWAY-compatible vector series for candidate RNAs. *Plant J* 71 (1):173-181.
- Schwarzerová K, Vondráková Z, Fischer L, Boříková P, Bellinvia E, Eliášová K, Havelková L, Fišerová J, Vágner M, Opatrný Z. (2010) The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. *BMC Plant Biology* 10.
- Stabentheiner, E., Zankel, A., and Pölt, P. (2010). Environmental scanning electron microscopy (ESEM)--a versatile tool in studying plants. *Protoplasma* 246: 89–99.
- Stuckens, J., Verstraeten, W. W., Delalieux, S., Swennen, R., & Coppin, P. (2009). A dorsiventral leaf radiative transfer model: Development, validation and improved model inversion techniques. *Remote Sensing of Environment*, 113(12), 2560-2573.
- Šlajcherová K, Fišerová J, Fischer L, Schwarzerová K. (2012) Multiple actin isotypes in plants: diverse genes for diverse roles? *Front Plant Sci.* 3:226
- Tapken, W. and Murphy, A.S. (2015). Membrane nanodomains in plants: capturing form, function, and movement. *J. Exp. Bot.* 66: 1573–1586.
- Ueda, H., Tamura, K., and Hara-Nishimura, I. (2015). Functions of plant-specific myosin XI: From intracellular motility to plant postures. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28: 30–38.
- Vanneste, S. and Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136: 1005–16.
- Vondráková Z, Eliášová K, Vágner M. (2014) The anti-actin drugs latrunculin and cytochalasin affect the maturation of spruce somatic embryos in different ways. *Plant Science* 221, 90-99.
- Yanagisawa, M., Desyatova, A.S., Belteton, S. a., Mallery, E.L., Turner, J. a., and Szymanski, D.B. (2015). Patterning mechanisms of cytoskeletal and cell wall systems during leaf trichome morphogenesis. *Nat. Plants* 1: 15014.
- Yeats TH a Rose JKC (2013) The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology*163:5-20
- Zheng, T., Waldron, K.W., and Donald, A.M. (2009). Investigation of viability of plant tissue in the environmental scanning electron microscopy. *Planta* 230: 1105–13.

#### 5.1.4. Mezinárodní spolupráce

Výzkumný tým VaV centra ÚEB AVČR udržuje dlouhodobě kontakty s výzkumnými týmy z předních zahraničních institucí ve všech oblastech, které jsou navrhovány k podpoře v rámci tohoto centra excelentního výzkumu.

Jedna z nejproduktivnějších spoluprací je dlouhodobě udržována s laboratoří Prof. Jiřího Frimla, předního vědce v oblasti rostlinné buněčné a vývojové biologie (H-index 73, 19 500 citací). Během poslední dekády (2005-2015) bylo publikováno celkem 16 původních sdělení a přehledných článků ve spolupráci mezi laboratoří Prof. Frimla a VaV centrem ÚEB AVČR, kde jsou spoluautory Jan Petrášek a Jiří Friml (viz CV Jana Petráška, příloha 6). Je důležité zmínit, že tato spolupráce byla a je exkluzivně založena na vzájemně podpůrných a komplementárních expertizách VaV centra ÚEB AVČR a laboratoří Prof. Frimla. Prof. Friml se během této spolupráce přesunul z University Tuebingen do předního pracoviště v oblasti rostlinných biotechnologií PSB VIB v belgickém Ghentu, kde strávil několik velice úspěšných let. Nyní je Prof. Friml pevně svázán s Institute of Science and Technology (IST Austria, Rakousko) a rád souhlasil v pokračování naší dlouhodobé a úspěšné spolupráce podpisem dopisu vyjadřujícího připravenost stát se partnerem navrhovaného centra excelentního výzkumu (viz příloha 6 a povinná příloha 19). Představuje tak hlavního "strategického" partnera navrhovaného centra. Prof. Friml vyjádřil připravenost spolupracovat jako doposud a dále spolupráci podpořit, tj. zajišťovat v součinnosti s IST Austria výměnu studentů a vědců, připravovat společné vědecké projekty a setkání výzkumných týmů. Výzkum laboratoře Prof. Frimla orientovaný na buněčnou biologii se tematicky překrývá s převážnou většinou výzkumných aktivit tohoto výzkumného programu. Další v současné době rozvíjené spolupráce, které jsou již podpořeny společnými publikacemi s Janem Petráškem a též dalšími členy VaV centra ÚEB AVČR zahrnují laboratoře Prof. Evy Benkové (IST Austria, Rakousko), Assoc. Prof. Christiana Luschniga (BOKU Vienna, Rakousko), viz. jeho podpůrný dopis (příloha 6), Assoc. Prof. Jürgena Kleine-Vehna



(BOKU Vienna, Rakousko), Prof. Dominique Van Der Straeten (Ghent University, Department of Physiology, Belgie), Prof. Petera Nicka (KIT Karlsruhe, SRN) a Prof. Anguse Murphyho (University of Maryland, USA).

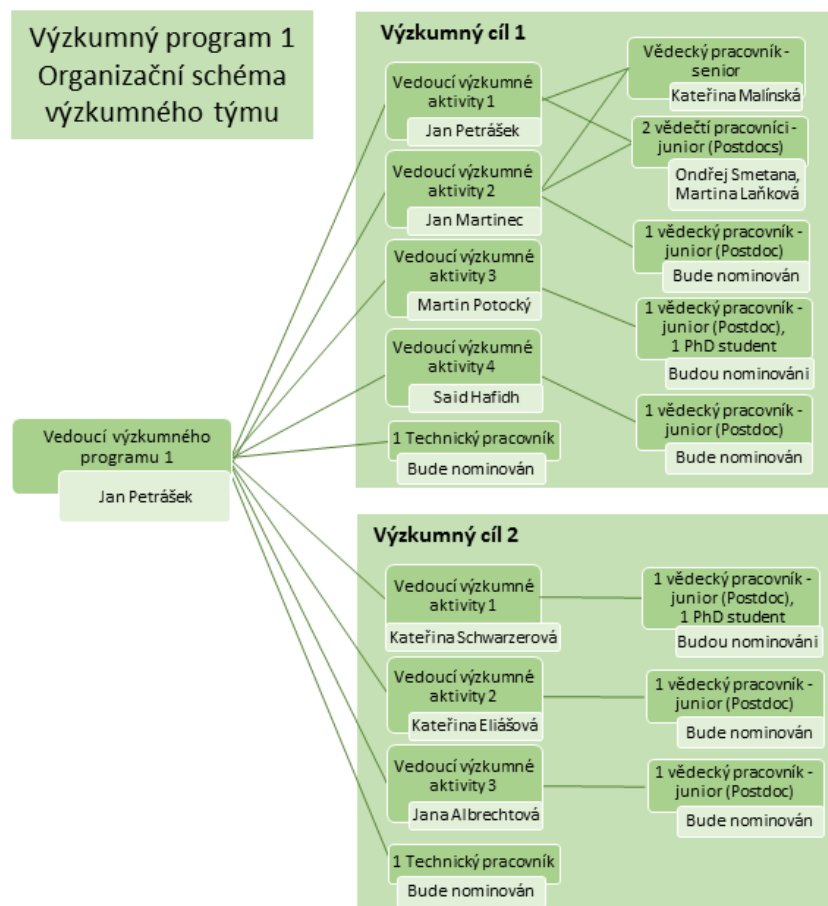
Výzkumný cíl 1 tohoto výzkumného programu bude rozvíjet v jeho jednotlivých aktivitách řadu běžících spoluprací. Spolupráce s laboratoří Dr. Eric Ruellanda (UPEC, Paris, Francie) je podpořena v dopise od Dr. Jacquese Moscovici (děkan UPEC) pro aktivitu 2 tohoto cíle (příloha 6). Laboratoř Doc. David Honyse, která je prostřednictvím Dr. Said Hafidha zodpovědná za aktivitu 4 tohoto cíle udržuje dlouhodobou spolupráci s Prof. Enrico Schleiffem, ředitelem Buchmann Institute of Molecular Life Sciences a Profesorem na Goethe University Frankfurt, SRN. Prof. Schleiff nabídl navrhovanému projektu velice širokou podporu (příloha 6) zahrnující výměnu vědců a studentů a společné grantové aplikace. Navíc je ovšem připraven jako jeho šéf zahrnout Frankfurt Center of Advanced Light Microscopy a Frankfurt Center of Electron Microscopy do scénáře této spolupráce.

Aktivity výzkumného cíle 2 tohoto výzkumného programu též dále podporují spolupráce s několika vedoucími laboratořemi v oboru. Vedle již výše zmíněné laboratoře Prof. Evy Benkové (IST Austria, Rakousko) and Prof. Petera Nicka (KIT Karlsruhe, SRN), výzkumná aktivita 1 tohoto cíle bude těžit ze spolupráce s Prof. Danielem Szymanskim (Purdue University, USA), Dr. Sabine Müller (University of Tübingen, SRN) a Dr. Camille Laroue (CNRS/ECOLAB, Toulouse, Francie). Dlouhotrvající spolupráce s laboratoří Dr. Grégory Mouille, vedoucího Analytical Chemistry Plant Observatory Laboratory v ústavu Institut Jean-Pierre Bourgin (INRA Versailles, France) podpoří navrhovaný projekt špičkovou analytikou doplňující elektron mikroskopické přístupy při studiu buněčné stěny, viz příloha 6. Aktivita 2 tohoto cíle zaměřené na extracelulární materiál bude velmi těžit z rozvíjené spolupráce s Dr. Lelu-Walter, ředitelkou výzkumu v National Institute of Agriculture Research (INRA, Val de Loire Orléans, Francie), které též na základě běžící spolupráce nabídla plnit roli "strategického partnera" pro toto téma (příloha 6). Probíhající spolupráce v rámci aktivity 3 tohoto cíle s Prof. Roeland Samson (University of Antwerpen, Belgie) a Dr. Petya Campbell (Joint Center for Earth Systems Technology, University of Maryland Baltimore County, NASA Goddard Space Flight Center, Biospheric Sciences Branch, USA) budou též pokračovat v rámci navrhovaného projektu.

#### 5.1.5. Výzkumný tým

##### ***Složení výzkumného týmu, role, výzkumné aktivity a harmonogram náboru***

Výzkumný tým výzkumného programu 1 je sestaven ze členů 6 laboratoří VaV centra ÚEB AVČR (příloha 2) a několika nově přijatých výzkumných pracovníků. Jak je patrné z organizačního schématu výzkumného týmu (Obr. 5.1.5), všech 7 výzkumných aktivit popsaných detailně v kapitole 5.1.3 je přiřazeno vedoucím výzkumných aktivit. Každá z těchto 7 aktivit bude prováděna pod vedením vedoucího výzkumné aktivity s přímou odpovědností nadřízenému tj. vedoucímu výzkumného programu Janu Petráškovi. Přehled všech jmenovitě nominovaných členů výzkumného týmu a členů, kteří budou nominováni, je uveden v tabulce (Tab. 5.1.1) s uvedením jejich role v projektu, H indexem and FTEs (full time equivalents). Pro každého jmenovitě uvedeného člena týmu je připojeno CV (příloha 7). Tato CV uvádí expertízu pracovníků, nejlepších 8 publikací s citacemi a další relevantní informace, vše ve vztahu k předkládaném návrhu (příloha 7).



**Obrázek 5.1.5: Organizační schéma výzkumného týmu výzkumného programu 1.** Vedoucí výzkumného programu bude odpovědný za koordinaci aktivit v obou výzkumných cílech. Vedoucí výzkumných aktivit budou přímo odpovědní vedoucímu výzkumného programu (Jan Petrářek), tento bude též přímý nadřízený dvou technických pracovníků.

**RNDr. Jan Petrářek, Ph.D., excelentní pracovník (2017-2022),** bude vedoucím celého výzkumného programu 1 a přímým řešitelem cíle 1, kde bude zodpovědný za aktivitu 1 výzkumného cíle 1. Bude se též účastnit supervizí výzkumného cíle 2. Bude též hlavním koordinátorem (ředitelem) celého navrhovaného centra excelentního výzkumu. Vedle koordinační role a publikačních aktivit bude provádět pokročilou fluorescenční konfokální mikroskopii a podílet se na elektronové mikroskopii (HR-REM a EREM) membránových proteinů na pracovišti partnera EEM ÚPT AVČR. Jak je patrné z příloženého CV (příloha 7), jeho expertíza leží v oblasti rostlinných hormonů, jejich spolupráce, buněčné polaridy, cytoskeletální dynamiky, mechanismu účinku auxinu, transportu auxinu a regulaci lokalizace a aktivity auxinových přenašečů.

**Ing. Martin Potocký, Ph.D., klíčový pracovník (2017-2022),** bude vedoucím výzkumné aktivity 3 výzkumného cíle 1, ale bude též se účastnit aktivit 1 and 2 tohoto cíle. Jak je patrné z příloženého CV (příloha 7), jeho expertíza leží v oblasti biochemie membránových lipidů a proteinů a výzkumu jejich mobility *in vivo* pomocí metod pokročilé konfokální mikroskopie v kombinaci s *in silico* metodami simulací molekulární dynamiky.

**Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D., klíčový pracovník (2017-2022),** bude vedoucí vedoucí výzkumné aktivity 3 výzkumného cíle 2. Bude koordinovat výzkum listových povrchů pomocí EREM ve spolupráci s pracovištěm partnera EEM ÚPT AVČR a též korelovat tyto

výstupy s výsledky měření reflektance. Bude nově přijata na projekt a přinese expertízu v oblasti výzkumu porostů měřením odrazivosti listů, ale i pomocí dálkového průzkumu Země v kombinaci s hlubokou znalostí anatomie a fyziologie rostlin, kterou garantuje jako profesorka na katedře experimentální biologie rostlin PŘF UK (příloha 7).

**RNDr. Jan Martinec, CSc., pracovník-senior (2017-2022)**, bude vedoucím výzkumné aktivity 2 výzkumného cíle 1. Bude se účastnit jak metod svázaných s pokročilou fluorescenční mikroskopií membránových mikrodomén, tak přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopii na pracovišti partnera EEM ÚPT AVČR. Je expertem v oblasti fosfolipidové signalizace a prostorové organizace rostlinné plazmatické membrány (příloha 7).

**Mgr. Kateřina Eliášová, Ph.D., pracovník senior (2017-2022)**, bude vedoucí výzkumné aktivity 2 výzkumného cíle 2. Bude se účastnit pokročilé konfokální mikroskopie na modelu somatických embryí jehličnanů spolupracovat na pracovišti partnera EEM ÚPT AVČR. Je expertem v oblasti anatomie rostlin a spektra postupů přípravy rostlinných pletiv pro světelnou a elektronovou mikroskopii (příloha 7).

**RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D., pracovník senior (2017-2022)**, bude vedoucí výzkumné aktivity 1 výzkumného cíle 2. Bude nově přijata na projekt pro tento program, aby koordinovala pokročilou konfokální mikroskopii v cytoskeletálních mutantech *Arabidopsis thaliana* a podílela se na přípravách vzorků pro elektronovou mikroskopii a prvkovou analýzu na pracovišti partnera EEM ÚPT AVČR. Je expertem v oblasti dynamiky cytoskeletu, buněčné morfogeneze a syntézy buněčné stěny (příloha 7).

**Ing. Kateřina Malínská, Ph.D., pracovník senior, (2017-2022)**, bude zahrnuta ve výzkumných aktivitách 1 a 2 cíle 1. Bude provádět pokročilou konfokální mikroskopii integrálních a periferních membránových proteinů. Bude garantem postupů klonování a přípravy nových DNA konstruktů v kooperaci s výzkumným programem 2 (SUPRAMOL ÚMC AV ČR a IKEM). Vedle molekulární biologie a biotechnologií je expertem na pokročilou konfokální mikroskopii membránových proteinů a jejich funkční testování pomocí postupů molekulární biologie (příloha 7).

**Mgr. Ondřej Smetana, Ph.D., pracovník junior (2017-2022)**, bude nově přijat pro tento výzkumný program k účasti v aktivitách 1 a 2 cíle 1. Jak vyplývá z jeho CV (příloha 7), posledních 5 let strávil jako postdoktorand v předním týmu rostlinné vývojové biologie. Vedle širokého arzenálu molekulárně biologických metod je expertem na pokročilou *in vivo* konfokální mikroskopii a bude jí vedle elektronové mikroskopie v projektu uplatňovat při studiu auxinových přenašečů, též bude zodpovědný za přípravu webové lokalizační databáze.

**Mgr. Martina Laňková, Ph.D., pracovník junior (2018-2022)**, bude zahrnuta ve výzkumných aktivitách 1 a 2 cíle 1 jako expert na metody FCS and RICS. Bude se též účastnit klonování, biochemických stanovení a přípravě protilátek, její CV je přiloženo v příloze 7.

**Said Hafidh, Ph.D., pracovník junior (2017-2022)**, bude vedoucím výzkumné aktivity 4 výzkumného cíle 1. Je expertem na konfokální mikroskopii nově identifikovaných členů pylového transkriptomu, který bude studovat v rámci tohoto programu též v kooperaci s partnerem EEM ÚPT AVČR. Jeho odbornost zahrnuje kompletní buněčnou biologii sexuálního rozmnožování rostlin (příloha 7).

Jak je vyznačeno v Tab. 5.1.1 and Obr. 5.1.5, bude nominováno dalších **8 výzkumných pracovníků (postdoktorandů a PhD studentů) s poloviční pracovní kapacitou a 2 technici s plnou pracovní kapacitou**. Předvýběr těchto členů týmu již probíhá, budou převážně vybírání z členů zapojených laboratoří, ale počítáme i s náborem nových pracovníků.

**Nový postdoktorand (2017-2022)** bude nominován do týmu řešícího aktivitu 1 výzkumného cíle 2. Ve spolupráci s týmy z SUPRAMOL ÚMCH AV ČR a EEM ÚPT AV ČR bude

analyzovat prvkové složení buněčných stěn rostlinných trichomů a transport materiálu do těchto struktur pomocí nanočástic.

**Nový postdoktorand** (2018-2022) bude nominován do týmu řešícího aktivitu 2 výzkumného cíle 1 a bude se účastnit klonování DNA a přípravy konstruktů pro identifikaci membránových mikrodomén a jejich fluorescenční a elektronové mikroskopie.

**Nový postdoktorand** (2018-2022) bude nominován do týmu řešícího aktivitu 3 výzkumného cíle 1 a bude se účastnit stanovením mobility membránových lipidů a proteinů *in vivo* pomocí pokročilé konfokální mikroskopie a *in silico* modelování dynamiky plazmatické membrány.

**Nový postdoktorand** (2017-2022) bude nominován do týmu řešícího aktivitu 2 výzkumného cíle 2. Bude se účastnit EREM elektronové mikroskopie na pracovišti EEM ÚPT AVČR a konfokální fluorescenční mikroskopie mezibuněčného materiálu u somatických embryí jehličnanů.

**Nový postdoktorand** (2018-2022) bude nominován do týmu řešícího aktivitu 4 výzkumného cíle 1, kde se bude podílet na konfokální fluorescenční mikroskopii a elektronové mikroskopii pylového transkriptomu a proteomu.

**Nový postdoktorand** (2017-2022) bude nominován do týmu řešícího aktivitu 3 výzkumného cíle 2. Bude analyzovat listové povrchy pomocí EREM na pracovišti partnera EEM ÚPT AVČR a korelovat tyto výstupy s měřením reflektance a daty z dálkového průzkumu Země.

**Nový PhD student** (2017-2022) bude nominován do týmu řešícího aktivitu 1 výzkumného cíle 2. Bude provádět elektronovou mikroskopii v nativních podmínkách (EREM) v kooperaci s partnerem EEM ÚPT AVČR na kolekci cytoskeletálních mutantů.

**Nový PhD student** (2017-2022) bude nominován do týmu řešícího aktivitu 3 výzkumného cíle 1. Bude studovat mobilitu lipidů a proteinů v PM pomocí metod pokročilé konfokální mikroskopie a optimalizovat postupy přípravy materiálu pro *in vivo* elektronovu mikroskopii (EREM).

**2 noví technici** (2017-2022) budou nominováni k podpoře týmů řešících výzkumné cíle 1 a 2. Budou zaručovat běžný laboratorní servis zahrnující kultivaci experimentálního rostlinného materiálu, přípravu kultivačních médií a pufrů a udržování laboratorních databází, ale i další nezbytné činnosti.

**Tabulka 5.1.1: Výzkumný tým výzkumného programu 1.** Viz text kapitoly 5.1.5 pro detailnější popis role jednotlivých pracovníků.

Jméno a příjmení	Pozice pracovníka	Role v týmu, příslušnost k výzkumné aktivitě	H-index	1.	2.	3.	4.	5.	6.
				rok	rok	rok	rok	rok	rok
Jan Petrášek	Excelentní pracovník	Vedoucí VP1, vedoucí aktivity 1, cíl 1	23	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Martin Potocký	Klíčový pracovník	Člen VP1, vedoucí aktivity 3, cíl 1	14	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Jana Albrechtová	Klíčový pracovník	Člen VP1, vedoucí aktivity 3, cíl 2	17	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Jan Martínek	Pracovník – Senior	Člen VP1, vedoucí aktivity 2, cíl 1	13	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Kateřina Eliášová	Pracovník - Senior	Člen VP1, vedoucí aktivity 2, cíl 2	4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Kateřina Schwarzerová	Pracovník - Senior	Člen VP1, vedoucí aktivity 1, cíl 2	11	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Kateřina Malínská	Pracovník - Senior	Člen VP1, člen aktivity 1,2, cíl 1	7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ondřej Smetana	Pracovník - Junior	Člen VP1, člen aktivity 1,2, cíl 1	4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Martina Laňková	Pracovník - Junior	Člen VP1, člen aktivity 1,2, cíl 1	5	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Said Hafidh	Pracovník - Junior	Člen VP1, vedoucí aktivity 4, cíl 1	8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - Junior, postdoktorand	Člen VP1, člen aktivity 1, cíl 2		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - Junior, postdoktorand	Člen VP1, člen aktivity 2, cíl 1		0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - Junior, postdoktorand	Člen VP1, člen aktivity 3, cíl 1		0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - Junior, postdoktorand	Člen VP1, člen aktivity 2, cíl 2		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - Junior, postdoktorand	Člen VP1, člen aktivity 4, cíl 1		0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - Junior, postdoktorand	Člen VP1, člen aktivity 3, cíl 2		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - Junior, PhD student	Člen VP1, člen aktivity 1, cíl 2		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - Junior, PhD student	Člen VP1, člen aktivity 3, cíl 1		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Technický pracovník	Člen VP1, člen aktivit 1-4, cíl 1		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bude nominován	Technický pracovník	Člen VP1, člen aktivit 1-3, cíl 2		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

## Výsledky klíčových a excelentních členů odborného týmu dosažené v letech 2011-2015

### RNDr. Jan Petrášek, Ph.D., excelentní pracovník

5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:

1. Marhavý, P., Bielach, A., Abas, M., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Pařezová, M., Petrášek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J., Benková, E.: Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell* 21, 796-804, 2011.  
ISI IF<sub>2011</sub> 14.030, počet citací: 104 (Scopus bez autocitací), 105 (WOS), 137 (Google Scholar)
2. Mravec, J., Petrášek, J., Li, N., Boeren, S., Karlova, R., Kitakura, S., Pařezová, M., Naramoto, S., Nodzynski, T., Dhonukshe, P., Bednarek, SY., Zažímalová, E., de Vries, S., Friml, J.: Cell Plate Restricted Association of DRP1A and PIN Proteins Is Required for Cell Polarity Establishment in *Arabidopsis*. *Current Biology* 21, 1055-1060, 2011.  
ISI IF<sub>2011</sub> 9.647, počet citací: 32 (Scopus bez autocitací), 27 (WOS), 43 (Google Scholar)
3. Leitner, J., Petrášek, J., Tomanov, K., Retzer, K., Pařezová, M., Korbei, B., Bachmair, A., Zažímalová, E., Luschnig, C.: Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier governs hormonally controlled adaptation in *Arabidopsis* root growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 8322-8327, 2012.  
ISI IF<sub>2012</sub> 9.737, počet citací: 54 (Scopus bez autocitací), 48 (WOS), 64 (Google Scholar)
4. Havelková, L., Nanda, G., Martinek, J., Bellinvia, E., Sikorová, L., Šlajcherová, K., Seifertová, D., Fischer, L., Fišerová, J., Petrášek, J., Schwarzerová, K.: Arp2/3 complex subunit ARPC2 binds to microtubules. *Plant Science* 241, 96-108, 2015.  
ISI IF<sub>2015</sub> 3.362, počet citací: 1 (Scopus bez autocitací), 1 (WOS), 1 (Google Scholar)
5. Jelínková, A., Müller, K., Fílová-Pařezová, M., Petrášek, J.: NtGNL1a ARF-GEF acts in endocytosis in tobacco cells. *BMC Plant Biology* 15, 272, 2015.  
ISI IF<sub>2015</sub> 3.631, počet citací: 1 (Scopus bez autocitací), 1 (WOS), 1 (Google Scholar)

5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel).

1. 2011-2014, Hlavní řešitel, GAČR, projekt GAP305/11/2476, Transport auxinu a cytoskelet v morfogenezi rostlinných buněk, 7 240 000 Kč
2. 2012-2015, Hlavní řešitel, Program interní podpory projektů mezinárodní spolupráce AV ČR s BOKU Vídeň, Rakousko, projekt M200381203, Molekulární mechanismy regulace membránových přenašečů auxinu, 731 000 Kč
3. 2016-2019, Partner za instituci ÚEB AV ČR v kooperativním projektu, Národní infrastruktura pro biologické a medicínské zobrazování (Czech Bioimaging), MŠMT, projekt LM 2015062, 1 924 000 Kč
4. 2011-2012, Hlavní řešitel, soutěž o finanční podporu nákladných přístrojů, konfokální mikroskop Nikon Eclipse Ti-E, Yokogawa CSU-X1, 8 000 000 Kč

5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:

V letech 2011-2015 nejsou žádné takové výsledky.

### **Ing. Martin Potocký, Ph.D., klíčový pracovník**

*5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. Pleskot R, Pejchar P, Žárský V, Staiger CJ, Potocký M. (2012) Structural insights into the inhibition of actin-capping protein by interactions with phosphatidic acid and phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate. *PLoS Computational Biology* 8(11):e1002765. ISI IF<sub>2012</sub> 4.867, počet citací: 13 (Scopus bez autocitací), 18 (WOS), 21 (Google Scholar)
2. Potocký M, Pejchar P, Gutkowska M, Jimenez MJ, Potocká A, Alché JD, Kost B, Žárský V. (2012) NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *Journal of Plant Physiology*, 169(16):1654-63. ISI IF<sub>2012</sub> 2.699, počet citací: 23 (Scopus bez autocitací), 24 (WOS), 31 (Google Scholar)
3. Pleskot R, Li J, Žárský V, Potocký M, Staiger CJ. (2013) Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends in Plant Science* 18(9):496-504. ISI IF<sub>2013</sub> 13.479, počet citací: 25 (Scopus bez autocitací), 26 (WOS), 31 (Google Scholar)
4. Potocký M, Pleskot R, Pejchar P, Vitale N, Kost B, Žárský V. (2014) Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derived biosensor. *New Phytologist* 203(2):483-94. ISI IF<sub>2014</sub> 7.672, počet citací: 11 (Scopus bez autocitací), 11 (WOS), 13 (Google Scholar)
5. Pleskot R, Cwiklik L, Jungwirth P, Žárský V, Potocký M (2015) Membrane targeting of the yeast exocyst complex. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1848(7):1481-1489. ISI IF<sub>2015</sub> 3.687, počet citací: 1 (Scopus bez autocitací), 1 (WOS), 4 (Google Scholar)

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel):*

1. 2013-2016, Hlavní řešitel, GA ČR, projekt 13-19073S, Mnohaúrovňová analýza funkce signálních lipidů a jejich vazebných proteinů v regulaci vrcholového růstu rostlinné buňky, 7 800 000 Kč
2. 2012, Hlavní řešitel, EMBO krátkodobý fellowship grant, Regulace pylové NADPH oxidázy pomocí Rac/Rop GTPáz, 8 000 EUR
3. 2009-2012, Spoluřešitel, GA AV ČR, projekt IAA601110916, Signální dráhy kyseliny fosfatidové a diacylglycerolu v regulaci polárního růstu rostlinných buněk, 4 000 000 CZK
4. 2009-2011, Hlavní řešitel, GA ČR, projekt 522/09/P299, Charakterizace NADPH oxidasy v pylu tabáku a její úloha v regulaci polárního růstu, 1 050 000 Kč

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

V letech 2011-2015 nejsou žádné takové výsledky.

### **Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D., klíčový pracovník**

*5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. Mišurec J; Kopačková V; Lhotáková Z; Hanuš J; Weyermann J; Entcheva-Campbell P, Albrechtová, J (2012) Utilization of hyperspectral image optical indices to assess the Norway spruce forest health status. *Journal of Applied Remote Sensing* 6, Article Number: 063545  
ISI IF<sub>2012</sub> 0.876, počet citací: 0 (Scopus bez autocitací), 3 (WOS), 7 (Google Scholar)
2. Kopačková, V; Mišurec, J; Lhotáková, Z; Oulehle, F, Albrechtová, J (2014) Using multi-date high spectral resolution data to assess the physiological status of macroscopically undamaged foliage on a regional scale. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 27: 169-186  
ISI IF<sub>2014</sub> 3.470, počet citací: 5 (Scopus bez autocitací), 1 (WOS), 6 (Google Scholar)
3. Kubínová, Z; Janáček, J; Lhotáková, Z; Kubínová, L, Albrechtová, J (2014). Unbiased estimation of chloroplast number in mesophyll cells: advantage of a genuine three-dimensional approach. *Journal of Experimental Botany*. 2014, 65(2), 609–620.  
ISI IF<sub>2014</sub> 5.526, počet citací: 2 (Scopus bez autocitací), 1 (WOS), 4 (Google Scholar)
4. Kopačková V; Lhotáková Z; Oulehle F; Albrechtová J (2015). Assessing forest health via linking the geochemical properties of a soil profile with the biochemical parameters of vegetation. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12 (6): 1987-2002  
ISI IF<sub>2015</sub> 2.344, počet citací: 0 (Scopus bez autocitací), 1 (WOS), 2 (Google Scholar)
5. Mišurec, J; Kopačková, V; Lhotáková, Z; Campbell, P; Albrechtová, J (2016). Detection of Spatio-Temporal Changes of Norway Spruce Forest Stands in Ore Mountains Using Landsat Time Series and Airborne Hyperspectral Imagery. *Remote Sensing* 8 (2) Article Number: 92.  
ISI IF<sub>2015</sub> 3.036, počet citací: 0 (Scopus bez autocitací), 0 (WOS), 0 (Google Scholar)

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel):*

1. 2012-2016, Hlavní řešitel, KONTAKT II, project n. LH12097, Inovace metod monitoringu zdravotního stavu porostů smrku ztepilého v Krušných horách s použitím hyperspektrálních dat. Zahraniční partner Dr. P. Campbell, NASA Goddard Space Flight Center and University of Maryland, USA, 3 438 000 Kč
2. 2010-2014 Hlavní řešitel, GA ČR, projekt P501-10-0340, Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a ozáření na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu dřevin na různých hierarchických úrovních, 3 464 000 Kč.

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

V letech 2011-2015 nejsou žádné takové výsledky.

#### 5.1.6. Charakteristika pořizovaného klíčového vybavení/funkčních modulů

V následujících tabulkách jsou uvedeny požadované klíčové vybavení a funkční moduly, jejich pořizovací náklady a technická specifikace. Jednotlivě jsou uvedeny přístroje, zařízení a software nezbytné pro realizaci projektu ve vazbě na VP1. Jmenovitě jsou uvedeny všechny položky s pořizovací cenou 1 mil Kč (bez DPH) a vyšší. Položky s nižší hodnotou jsou sdruženy



do funkčních modulů, dle jejich povahy a provázanosti s konkrétní výzkumnou aktivitou VP1, ale též VP2 a VP3.

Požadované investice jsou též popsány podrobně v rozpočtu (příloha 8 a povinná příloha v systému MS2014+.), komentáři k rozpočtu (příloha 9) a jejich ceny podloženy soupisem jednotlivých cenových nabídek (příloha 10).

Klíčové vybavení / funkční modul (seřadíte dle ceny sestupně od nejvyšší)	Počet kusů položky	Plánovaná cena celkem bez DPH (tis. Kč)
1. Funkční modul zařízení pro upgrade snímání na spinning disk mikroskopu a stereomikroskopu	1	1 961
<p><u>Charakteristické vlastnosti:</u> Modul sestává celkem ze 7 položek. Obsahuje kamery pro fluorescenční mikroskopii na spinning disk mikroskopu (ultracitlivá EMCCD kamera Andor iXon ULTRA) a fluorescenčním stereomikroskopu (CMOS kamera Nikon s vysokým rozlišením), ovládací software pro získání a analýzu obrazu, dva ovládací PC, jeden PC pro vyhodnocování obrazů a multilicenci softwarového obrazového analyzátoru NIS elements. Upgrade stávajících mikroskopů formou vylepšení snímání a následného vyhodnocení bude využit ve všech aktivitách obou výzkumných cílů VP 1.</p> <p><u>Účel pořizovaného vybavení:</u> Vysoce citlivá EMCCD kamera bude využita pro upgrade snímání na stávajícím fluorescenčním spinning disk mikroskopu. Umožní zejména zachytit slabé fluorescenční signály s vylepšeným prostorovým rozlišením oproti stávající kameře. Bude tak možné zachytit jak prostorové rozložení lipidů a proteinů v oblasti plazmatické membrány, tak jeho dynamiku. Toto zařízení je tak klíčové pro zdárné řešení výzkumného cíle 1, především v aktivitách 1-3 a výzkumného cíle 2 v aktivitě 1. CMOS kamera s vysokým prostorovým rozlišením bude využita pro upgrade snímání na stávajícím fluorescenčním stereomikroskopu Nikon SDZ25, kde již stávající kamera nevyhovuje a nelze provozovat pod novým operačním systémem. Systém bude doplněn o PC s programem NIS-Elements pro zachycení obrazů a obrazovou analýzu a taktéž o softwarový EDF modul pro skládání 3D obrazů ze snímků povrchů somatických embryí (aktivita 2, cíl 2). Dva další PC budou využity pro post-processing snímků z obou mikroskopů. Celá sestava bude doplněna o novou verzi multilicence softwarového analyzátoru NIS-Elements, který je v týmech výzkumného centra ÚEB AVČR využíván delší dobu, ale je potřeba provést jeho upgrade na novou verzi související s přechodem systémů na platformu Win10.</p> <p><u>Připravenost infrastruktury:</u> Infrastruktura ÚEB AVČR je připravena bez nutnosti dalších nákladů. Spinning disk je provozován v rámci zobrazovací jednotky ÚEB AVČR v budově B1 ÚEB AVČR, stereomikroskop v rámci laboratoře řešící aktivitu 2 výzkumného cíle 2 VP1 v budově B1.</p>		
2. Funkční modul zařízení pro přípravu experimentálního materiálu a molekulární biologii rostlin	1	1 630
<p><u>Charakteristické vlastnosti:</u> Modul sestává z přístrojového vybavení pro molekulární biologii rostlin, jmenovitě z inkubačních třepaček (2 ks), automatizovaných autoklávů (2 ks) a PCR termocyklérů (4 ks).</p>		

Tato zařízení budou využita ve všech aktivitách obou výzkumných cílů výzkumného programu 1.

Účel pořizovaného vybavení:

Temperovaná třepací inkubační zařízení (2ks) a automatizované autoklávy (2 ks) budou využity pro standardizovanou přípravu buněčných transgenních linií tabáku a *Arabidopsis thaliana* a přípravu sterilních kultivačních médií a materiálu. V řadě případů nahradí zastaralé vybavení, které již dosluhuje, a náklady spojené s jeho udržováním jsou příliš vysoké. S vybavením tohoto modulu budou pracovat zejména členové řešící výzkumný cíl 1 (aktivity 1, 2 a 3) a výzkumný cíl 2 (aktivity 1 a 2), jak specifikováno v přehledu na obr. 5.1.1. S ohledem na velkou citlivost dějů asociovaných s plazmatickou membránou bude nutná zejména kvalitní kontrola teplotních poměrů inkubace pro následnou mikroskopickou, biochemickou a molekulárně biologickou analýzu kultivovaného materiálu.

PCR termocykléry ve dvou modifikacích se stříbrným blokem (2ks) a hliníkovým blokem (2ks) budou sloužit pro rutinní postupy PCR v řadě modifikací především v aktivitách 1, 2 a 4 výzkumného cíle 1 a aktivitách 1 a 2 výzkumného cíle 2.

Připravenost infrastruktury:

Infrastruktura ÚEB AVČR je připravena bez nutnosti dalších nákladů. Přístroje budou umístěny v laboratořích a kultivačních prostorech budovy B1 ÚEB AVČR.

3. Automatizovaná stanice pro histochemické metody	1	1 621
--	---	-------

Charakteristické vlastnosti:

Tato pipetovací stanice je určena pro imunohistochemická a histochemická barvení v biologickém materiálu včetně rostlinných pletiv. Umožňuje barvit jak proteiny, tak RNA či DNA. Systém obsahuje modul pro imunoznačení v částech rostlin či celých rostlinách, tzv. whole mounts.

Účel pořizovaného vybavení:

Účelem pořízení tohoto zařízení je rozšíření a standardizace protokolů pro imunofluorescenční zobrazování proteinů v rostlinném materiálu, které je na pracovišti výzkumného centra ÚEB AVČR realizováno v obdobné stanici, která byla instalována v roce 2009 a kapacitně nebude dostačovat pro navrhovaný projekt. Pořízením zamýšleného zařízení (v roce 2019) dojde k zpřístupnění nových imunocytochemických metod pro všechny aktivity obou výzkumných cílů VP1. Též však budou na tomto zařízení cíleně testovány nové protilátky značené nanočásticemi, připravené v rámci řešení VP2 a připravovány značené vzorky pro elektronovou mikroskopii v rámci řešení VP3.

Připravenost infrastruktury:

Infrastruktura ÚEB AVČR je připravena bez nutnosti dalších nákladů. Přístroj bude umístěn ve druhém patře budovy B1 ÚEB AVČR.

### 5.1.7. Vazba výzkumného programu na rozpočet projektu

Rozpočet pro tento výzkumný program je uveden v příloze 8 a komentář tohoto rozpočtu v příloze 9. Tvoří též součást povinných příloh vložených do aplikace do systému MS2014+.

## 5.2. Výzkumný program 2: Dynamika nano- a mikročasticových systémů v živých buňkách

### Abstrakt

Postupné zavádění nanočasticových a mikročasticových systémů do medicíny i technických oborů způsobilo revoluci v řadě technologií. Detailní pochopení interakcí těchto systémů s živými organismy, především živočichy, je klíčem nejen k medicínskému použití těchto systémů, ale i k minimalizaci, případně úplné eliminaci zdravotních a environmentálních rizik použití takových systémů. Výzkumný program staví na mnohaletých zkušenostech, znalostech, zavedené spolupráci a synergii VaV center na Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) a na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky (ÚMCH AVČR). Výzkumné centrum v IKEM má zkušenosti s tkáňovými kulturami živočišných buněk, transplantací buněk, zvířecími modely, konfokální mikroskopií, radionuklidovými technikami a zobrazováním nukleární magnetickou rezonancí a optickým zobrazováním. Výzkumné centrum na ÚMCH AVČR (SUPRAMOL) má zkušenosti zejména s přípravou, fyzikálně-chemickou charakterizací, radiační stabilitou a instrumentálním studiem polymerů a supramolekulárních polymerních soustav pro biomedicínské aplikace včetně zobrazovacích multimodálních sond, konjugáty polymerů, protilátek a dalších proteinů, mikro- a nanočasticemi. Záměrem výzkumného programu je prozkoumat dynamiku nano- a mikročastic v buněčných systémech ze tří hlavních úhlů pohledu, reprezentovaných 3 výzkumnými cíly: 1) Polymerní systémy jako nástroje rozšiřující možnosti studia buněk mikroskopickými technikami; 2) Rozpustné a supramolekulární systémy citlivé na oxidativní stres a přítomnost reaktivních forem kyslíku pro dopravu biologicky aktivních substancí do cílových buněk a buněčných kompartmentů a 3) Dynamika buněčného jádra a možnosti dopravy biologicky aktivních substancí do a z něj.

### 5.2.1. Vazba na výzkumné programy centra, rozvoj centra

Tento výzkumný program je navržen jako přímé pokračování několika nedávných aktivit výzkumné činnosti centra ÚMCH "SUPRAMOL", které jsou specifikovány v samostatné kapitole 3.4. Všechny tyto aktivity představují vysoce kvalitní výzkum, který byl v posledních deseti letech prováděn ve výzkumném centru ÚMCH AV ČR s důrazem na samoorganizované nanosystémy jako jsou micely, polymerozómy a nanočastice a to jak ve smyslu základního výzkumu, tak cíleného aplikovaného výzkumu pro biomedicínské a technické aplikace. To nám umožňuje efektivně realizovat poznatky z oblasti základního výzkumu do praktických výstupů také díky zkušenostem a zařízení pro organickou i polymerní syntézu stejně jako pro komplexní fyzikálně-chemickou charakterizaci nanosystémů, kde in-house pokrýváme všechny potřebné oblasti.

Nedávno studované projekty zahrnují polymerní micely jako theranostická radiofarmaka, polymerní nanosystémy reagující na vnější podněty skládané změnami pH, teploty a redox potenciálu, lipázami a reaktivními formami kyslíku biologicky odbouratelné polyesterové nanočastice pro cílenou dopravu a řízené uvolňování léčiv, pevné lipidické nanočastice pro fotodynamickou terapii, polyesterové nanočastice pro dopravu imunomodulátorů pro imunoterapii nádorových onemocnění, nanočastice kovů s definovaným tvarem a velikostí jako značky konjugovatelné s polymery pro elektronovou mikroskopii, kontrastní činidla pro zobrazování pomocí <sup>19</sup>F-magnetické rezonance na bázi fluorovaných polymerů a nanočastice skládané ionty biogenních kovů. Pomocí zavedených experimentálních technik na 1.LF UK se

bude studovat efekt kontrastní látky také na buněčné úrovni, kde se bude ověřovat cytotoxicita kontrastní látky, funkčnost značené buňky, intracelulární lokalizace kontrastní látky a její následná metabolizace. Část výzkumu se věnuje vychytávačům mědi pro perorální terapii Wilsonovy choroby a vychytávačům reaktivních forem kyslíku pro hojení ran (v současné době komerčně jako Hemagel®). V zavedené radionuklidové laboratoři, rovněž zahrnuté v tomto projektu, pracujeme na radioznačených polymerech, kde radioaktivní značka slouží jako aktivní theranostická složka, jako stopovač pro sledování osudu systému v komplexním biologickém prostředí nebo pro kvantifikaci ultrastopových množství biologicky aktivních složek v polymerních implantátech. Studujeme rovněž radiolýzu biologicky polymerů ionizujícím zářením. VaV centrum ÚMCH AV ČR "SUPRAMOL" tedy představuje vynikající platformu se synergickou oblastí zájmu a zkušenostmi s dalšími partnery ke splnění cílů navrhovaného projektu.

### 5.2.2. Současný stav poznání

Interakcí elektronového svazku (beta záření) využívaného při elektronové mikroskopii s maticí dochází k jejímu poškození, což je zvláště problematické u nativních vzorků.[1-3] U živých buněk je hlavní životně důležitou strukturou poškozovanou radiací DNA v jádře buňky, což vede podle intenzity poškození k mutacím až smrti buňky.[4, 5] Při vyšších dávkách ozáření hraje roli i poškození buněčných membrán. Radiační poškození je jen z malé části dáno přímou interakcí letících elektronů s cílovou strukturou, z naprosté většiny je způsobeno nepřímo tím, že ionizující záření vygeneruje ve vodě tvořící většinu hmoty živých systémů reaktivní formy kyslíku, které pak chemicky poškozují buněčné struktury. Nejdůležitějšími reaktivními formami kyslíku takto vznikajícími v živých systémech a podílejících se na oxidativním stresu jsou peroxid vodíku, superoxid, hydroxylové a hydroperoxylové radikály. Tyto všechny jevy přispívají k tomu, že vzorek je při elektronové mikroskopii elektrony poškozován a elektronová mikroskopie v současné podobě má velmi limitované možnosti studia u nativních (živých vzorků).

Toto poškození je třeba jednak detekovat, jednak omezit na minimum. Detekce v makroskopickém měřítku využívá dozimetry různé konstrukce (většinou založené na ionizaci plynu, scintilaci, případně radiochemické reakci - filmové dozimetry, chemické radiochromní dozimetry založené na radiolýze s následným spektrofotometrickým vyhodnocením) [6]. Možnosti detekce in situ během vlastní elektronové mikroskopie jsou však velmi limitované [7-9].

Antioxidantů zřáhajících reaktivní radikály včetně reaktivních forem kyslíku je popsána celá řada, jak nízkomolekulárních (např. kyselina askorbová, tokoferol, polyfenoly) tak i polymerních [10, 11]. Naprostá většina z nich je stechiometrických, tj. reakcí s radikály se antioxidant vyčerpává. To je samozřejmě zejména u vyšších radiačních dávek nevýhodou. V živých systémech však existují i katalytické antioxidanty katalyzující degradaci reaktivních forem kyslíku např. disproportionací, například enzymy superoxid dismutáza nebo kataláza [12-15]. Tyto enzymy však mají omezenou stabilitu např. vůči změnám pH.

Vlivu radiace na polymerní struktury přírodního i syntetického původu lze ovšem i využít, a to k radiačnímu síťování, kde lze připravit gely a nerozpustná nanovlákná bez nutnosti přidávat chemická síťovadla [16, 17].

Prostorové rozložení membránových proteinů hraje klíčovou roli v membránových procesech, protože např. agregace proteinů vlivem vazby ligandu často spouští vnitrobuněčné signální odezvy. Ačkoliv je tato oblast v současné době intenzivně studována, stále zůstává

v této oblasti mnoho nezodpovězených otázek. Zobrazení tohoto rozložení je možné zejména fluorescenční [18] nebo elektronovou [19] mikroskopií za použití příslušných značek, například fluorescenčně nebo kovovými nanočásticemi značených protilátek a jiných proteinů [18, 20]. Výhodné by ovšem bylo mít multimodální značky zobrazitelné jak elektronovou, tak optickou mikroskopií současně vzhledem ke komplementaritě obou modalit zobrazení, a to značky homogenní pokud jde o složení. Zobrazení magnetickou rezonancí (MRI) má sice nižší rozlišení než optická či elektronová mikroskopie, ale umožňuje na nativních biologických subjektech zobrazit biologické děje na funkční úrovni, zejména pokud je použito zobrazení pomocí <sup>19</sup>F-MRI, kde je minimální přirozené pozadí díky malému obsahu fluoru ve tkáni [21-24].

Poškození složitého mechanismu významných signalizačních drah vede k misregulaci jejich cílových genů, což je častým průvodním jevem různých onemocnění a vývojových vad [25, 26]. Wnt a Shh signalizace představují signalizační dráhy hrající významnou roli také v pluripotenci a diferenciaci embryonálních kmenových (ES) buněk [27-29]. Ačkoliv pochopení molekulárního mechanismu těchto dvou signalizačních drah v posledních výrazně pokročilo, velice málo pozornosti bylo věnováno dlouhým nekódujícím RNA (lncRNA) molekulám, které se v poslední době ukazují jako významný faktor ovlivňující funkce proteinů a genovou expresi [30, 31]. Kanonická Wnt signalizace je aktivována vazbou Wnt molekul na povrchové receptory Lrp5/6 a Frizzled, což dále vede k transportu beta-kenatinu z cytoplazmy do jádra. V jádře beta-kenatin vytvoří komplex s transkripčními faktory Tcf/Lef, čímž dojde k jejich aktivaci a spuštění transkripce jejich cílových genů [26]. Shh signalizace je aktivována interakcí Shh ligandu s receptorem Smo, což vede k aktivaci jaderných transkripčních faktorů Gli a spuštění transkripce jejich cílových genů [26]. Potenciální interakce různých lncRNA molekul s jadernými mediátory Wnt signalizace (beta-kenatin a Tcf/Lef proteiny) a Shh signalizace (Gli proteiny) by významně ovlivnila jejich funkci a transkripční aktivitu jejich cílových genů a tím i jejich biologické funkce včetně role v diferenciaci ES buněk.

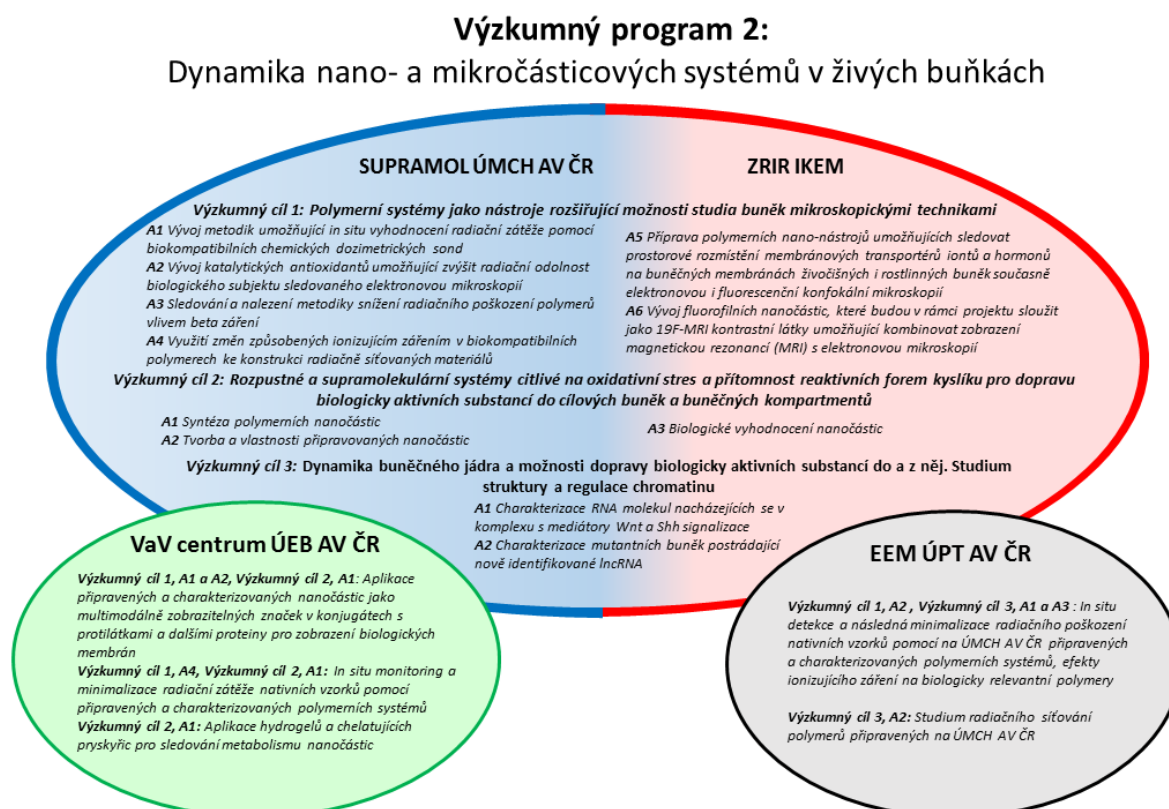
### **Citace zmíněné v kapitole 5.2.2:**

1. Kourkoutis, L.F., J.M. Plitzko, and W. Baumeister, *Electron Microscopy of Biological Materials at the Nanometer Scale*, in *Annual Review of Materials Research*, Vol 42, D.R. Clarke, Editor. 2012. p. 33-58.
2. Massover, W.H., *New and unconventional approaches for advancing resolution in biological transmission electron microscopy by improving macromolecular specimen preparation and preservation*. *Micron*, 2011. 42(2): p. 141-151.
3. Baker, L.A. and J.L. Rubinstein, *RADIATION DAMAGE IN ELECTRON CRYOMICROSCOPY*, in *Methods in Enzymology*, Vol 481: *Cryo-Em, Part a - Sample Preparation and Data Collection*, G.J. Jensen, Editor. 2010, Elsevier Academic Press Inc: San Diego. p. 371-388.
4. Chaurasia, M., et al., *Radiation-induced autophagy: mechanisms and consequences*. *Free Radical Research*, 2016. 50(3): p. 273-290.
5. Mavragani, I.V., et al., *Key mechanisms involved in ionizing radiation-induced systemic effects. A current review*. *Toxicology Research*, 2016. 5(1): p. 12-33.
6. Oldham, M. and Iop, *Radiochromic 3D Detectors*, in *8th International Conference on 3d Radiation Dosimetry*. 2015, Iop Publishing Ltd: Bristol.
7. Hsieh, L.-L., K.-Y. Cheng, and B.-T. Hsieh, *A Novel Thin NIPAM Gel Cassette Dosimeter for Photon-Beam Radiotherapy*. *Plos One*, 2012. 7(3).
8. Pushpavanam, K., et al., *A Colorimetric Plasmonic Nanosensor for Dosimetry of Therapeutic Levels of Ionizing Radiation*. *Acs Nano*, 2015. 9(12): p. 11540-11550.
9. Chiappelli, M.C., et al., *Photonic polymer multilayers for colorimetric radiation sensing*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2015. 208: p. 85-89.

10. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015. 97: p. 55-74.
11. Amber, K.T., M.I. Shiman, and E.V. Badiavas, *The Use of Antioxidants in Radiotherapy-Induced Skin Toxicity*. Integrative Cancer Therapies, 2014. 13(1): p. 38-45.
12. Bannister, W.H., *FROM HEMOCUPREIN TO COPPER-ZINC SUPEROXIDE-DISMUTASE - A HISTORY ON THE 50TH ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF HEMOCUPREIN AND THE 20TH ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF SUPEROXIDE-DISMUTASE*. Free Radical Research Communications, 1988. 5(1): p. 35-42.
13. Kindekov, I., et al., *Radioprotective effect of Rapana thomasiana hemocyanin in gamma induced acute radiation syndrome*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014. 28(3): p. 533-539.
14. Henke, S.L., *Superoxide dismutase mimics as future therapeutics*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 1999. 9(2): p. 169-180.
15. Wozniak, M. and M. Czyz, *Superoxide dismutase mimetics: Possible clinical applications*. Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej, 2008. 62: p. 613-624.
16. Barba, B.J.D., C. Tranquilan-Aranilla, and L.V. Abad, *Hemostatic potential of natural/synthetic polymer based hydrogels crosslinked by gamma radiation*. Radiation Physics and Chemistry, 2016. 118: p. 111-113.
17. Haji-Saeid, M., et al., *Radiation processing of natural polymers: The IAEA contribution*. Radiation Physics and Chemistry, 2010. 79(3): p. 255-260.
18. Gibbs, K.A., et al., *Complex spatial distribution and dynamics of an abundant Escherichia coli outer membrane protein, LamB*. Molecular Microbiology, 2004. 53(6): p. 1771-1783.
19. Zeev-Ben-Mordehai, T., et al., *Extracellular Vesicles: A Platform for the Structure Determination of Membrane Proteins by Cryo-EM*. Structure, 2014. 22(11): p. 1687-1692.
20. Philimonenko, V.V., et al., *Simultaneous detection of multiple targets for ultrastructural immunocytochemistry*. Histochemistry and Cell Biology, 2014. 141(3): p. 229-239.
21. Boenner, F., et al., *Monocyte imaging after myocardial infarction with F-19 MRI at 3 T: a pilot study in explanted porcine hearts*. European Heart Journal-Cardiovascular Imaging, 2015. 16(6): p. 612-620.
22. Gaudet, J.M., et al., *Tracking the Fate of Stem Cell Implants with Fluorine-19 MRI*. Plos One, 2015. 10(3).
23. Helfer, B.M., et al., *Visualizing the fate of immunotherapeutic cells by 19F MRI*. Journal of Nuclear Medicine, 2015. 56(2): p. 10-10.
24. Yuan, Y., et al., *Intracellular Self-Assembly and Disassembly of F-19 Nanoparticles Confer Respective "Off" and "On" F-19 NMR/MRI Signals for Legumain Activity Detection in Zebrafish*. Acs Nano, 2015. 9(5): p. 5117-5124.
25. Zardawi, S.J., et al., *Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer*. Histol Histopathol, 2009. 24(3): p. 385-98.
26. Taipale, J. and P.A. Beachy, *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. Nature, 2001. 411(6835): p. 349-54.
27. Lien, W.H. and E. Fuchs, *Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/beta-catenin signaling*. Genes Dev, 2014. 28(14): p. 1517-32.
28. Lien, W.H., et al., *In vivo transcriptional governance of hair follicle stem cells by canonical Wnt regulators*. Nat Cell Biol, 2014. 16(2): p. 179-90.
29. Chuang, J.H., L.C. Tung, and Y. Lin, *Neural differentiation from embryonic stem cells in vitro: An overview of the signaling pathways*. World J Stem Cells, 2015. 7(2): p. 437-47.
30. Hendrickson, D.G., et al., *Widespread RNA binding by chromatin-associated proteins*. Genome Biol, 2016. 17(1): p. 28.
31. Wilusz, J.E., H. Sunwoo, and D.L. Spector, *Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world*. Genes Dev, 2009. 23(13): p. 1494-504.

### 5.2.3. Výzkumné cíle, aktivity a výsledky

Tento výzkumný program je vázán primárně na VaV pracoviště SUPRAMOL ÚMCH AVČR a ZRIR IKEM. Interdisciplinární charakter tohoto výzkumu je patrný z mnoha společných realizací v rámci 3 výzkumných cílů a celkem 11 aktivit. Jejich schematické zobrazení je uvedeno v Obr. 5.2.1. Podrobný popis každého výzkumného cíle a každé aktivity je popsán v následujícím textu.



**Obrázek 5.2.1: Schematické zobrazení výzkumného programu 2.** Těžištěm tohoto výzkumného programu je VaV pracoviště SUPRAMOL ÚMCH AV ČR (modrá) a ZRIR IKEM (červená). Zapojení navrhovatelského VaV pracoviště ÚEB AV ČR (zelená) a partnerského VaV pracoviště EEM ÚPT AV ČR (šedivá) je specifikováno pro jednotlivé výzkumné aktivity SUPRAMOL ÚMCH AV ČR a ZRIR IKEM.

#### **Výzkumný cíl 1: Polymerní systémy jako nástroje rozšiřující možnosti studia buněk mikroskopickými technikami**

Interakcí elektronového svazku (beta záření) využívaného při elektronové mikroskopii s maticí dochází k jejímu poškození, což je zvláště problematické u nativních vzorků. U živých buněk je hlavní životně důležitou strukturou poškozovanou radiací DNA v jádře buňky, což vede podle intenzity poškození k mutacím až smrti buňky. Při vyšších dávkách ozáření hraje roli i poškození buněčných membrán. Radiační poškození je jen z malé části dáno přímou interakcí letících elektronů s cílovou strukturou, z naprosté většiny je způsobeno nepřímo tím, že ionizující záření vygeneruje ve vodě tvořící většinu hmoty živých systémů reaktivní formy kyslíku, které pak chemicky poškozují buněčné struktury. Nejdůležitějšími reaktivními formami kyslíku takto vznikajícími v živých systémech a podílejících se na oxidativním stresu jsou peroxid vodíku, superoxid, hydroxylové a hydroperoxylové radikály.

**Výzkumný cíl 1 obsahuje proto celkem 6 aktivit, které všechny směřují k podstatnému vylepšení možností studia buněk metodami fluorescenční, elektronové a magnetické**

**rezonanční mikroskopie.** Aktivity jsou zaměřeny na vyvinutí metodik pro *in situ* sledování radiační zátěže v nativních vzorcích, vyvinutí katalytických antioxidantů pro snížení tohoto radiačního poškození, nalezení metodiky snížení radiačního poškození polymerů vlivem beta záření, využití změn způsobených ionizujícím zářením v biokompatibilních polymerech ke konstrukci radiačně síťovaných materiálů, příprava polymerních nanonástrojů umožňujících sledovat prostorové rozmístění membránových transportérů iontů a hormonů na buněčných membránách živočišných i rostlinných buněk současně elektronovou i fluorescenční konfokální mikroskopií a příprava a využití fluorofilních nanočástic, které budou v rámci projektu sloužit jako <sup>19</sup>F-MRI kontrastní látky umožňující kombinovat tuto modalitu zobrazení s elektronovou mikroskopií (inherentně kontrastní díky přítomnosti atomů fluoru) i fluorescencí (po zabudování fluorescenční značky).

***Aktivita 1: Vývoj metodik umožňující in situ vyhodnocení radiační zátěže pomocí biokompatibilních chemických dozimetrických sond.***

***Vedoucí aktivity:*** Mgr. Martin Hrubý, Ph.D.

Biokompatibilní chemické dozimetrické sondy budou založeny na polymerech nesoucích dvě spektrálně odlišné fluorescenční značky, jednu snadno degradovatelnou reaktivními formami kyslíku vynikajícími při ozáření a druhou radiačně stabilní sloužící jako interní kalibrace na koncentraci sondy. Vyhodnocení radiační zátěže bude provedeno porovnáním intenzity fluorescence těchto dvou fluoroforů v daném místě.

Alternativně bude připraven polymer nesoucí radiačně stabilnější fluorofor a zhášec fluoroforu fluorescenčním rezonančním přenosem energie citlivý na radiolýzu. Radiolýzou zhášec pak dojde k rozsvícení radiačně stabilnějšího fluoroforu. Protože použitý polymer bude biokompatibilní a nebude obsahovat toxické kovy, nebudou tyto sondy poškozovat buňky. Toto vyhodnocení radiační zátěže poslouží zejména jako zpětná vazba při vývoji instrumentace šetrné k živému objektu. Další vyhodnocení efektu radiačního poškození bude provedeno elektronovou paramagnetickou rezonancí pomocí spinově značených polymerů i *in situ* elektrochemickými metodami. Na podobném principu (kombinace pH-responsivní a pH-necitlivé fluorescenční značky na jednom polymeru) budou použity sondy pro prozkoumání radiačně a fotochemicky induované změny pH v cílových buňkách.

***Milníky: Fluorescenční sondy pro vyhodnocení radiační zátěže a pro vyhodnocení lokálních radiačně způsobených změn pH.***

***Aktivita 2: Vývoj katalytických antioxidantů umožňující zvýšit radiační odolnost biologického subjektu sledovaného elektronovou mikroskopií.***

***Vedoucí aktivity:*** Ing. Zdena Sedláková, CSc.

Antioxidanty budou připraveny zejména na bázi polymerních konjugátů proteinů s enzymaticky nestechiometricky vysokou antioxidační aktivitou (superoxid dismutáza a její aktivitu napodobující stabilnější manganité salenové komplexy, kataláza a její aktivitu napodobující stabilnější porfyrinové a ftalocyaninové komplexy atd.). Na rozdíl od stechiometricky působících antioxidantů (kyselina askorbová, tokoferol aj.) jsou tyto enzymy „nevýčerpatelné“ a mnohem aktivnější. Polymerní složka ochrání enzym před chemickou degradací buňkou a usnadní penetraci do buněčných struktur, které je účelem takto před radiací chránit. Tyto polymerní antioxidanty budou srovnány s antioxidanty na bázi stericky bráněných aminů 1,1,6,6,-tetramethylpiperidinového typu.

***Milníky: Antioxidant snižující radiační zátěž nativního vzorku.***



***Aktivita 3: Sledování a nalezení metodiky snížení radiačního poškození polymerů vlivem beta záření.***

***Vedoucí aktivity:*** Mgr. Martin Hrubý, Ph.D.

Biokompatibilní polymery a jejich definované supramolekulární agregáty (micely, nanočástice liposomy) jsou klíčovými stavebními prvky moderních nanofarmak, stále je však přehlížena jejich radiační odolnost, která však může být velmi podstatná pro radiační sterilizaci takových farmak, případně pokud je polymer použit pro konstrukci polymerního diagnostického nebo terapeutického radiofarmaka.

***Milníky:*** Soubor dat o radiační stabilitě polymerů v biologickém prostředí.

***Aktivita 4: Využití změn způsobených ionizujícím zářením v biokompatibilních polymerech ke konstrukci radiačně síťovaných materiálů.***

***Vedoucí aktivity:*** RNDr. Petr Štěpánek, DrSc.

Budeme vyvíjet koncepčně nový mikrovláknový, biologicky odbouratelný funkční materiál připravený z modifikovaného rezervního polysacharidu přítomného v lidském organismu (glykogen) jako materiál pro hojení ran určený pro výrobu obvazů/rozhraní přicházejících do přímého kontaktu s ránou. Dvojnásobné vazby budou v glykogenu vytvořeny allylací a budou dále využity k síťování mikrovláken. Trojnásobné vazby budou vytvořeny propargylací a budou sloužit pro další „click“ funkcionalizaci mikrovláken s bioaktivním peptidem. K výrobě nanovláken/mikrovláken z allylovaného a/nebo propargylovaného glykogenu bude použita jednoduchá metoda bez užití rozpouštědel, zahrnující řízené zmrazení a následně sušení mrazem, která umožňuje přípravu silných vrstev. Síťování vzorků se provede pomocí beta záření z mikrotronu.

***Milníky:*** Radiačně síťovaný materiál vhodný pro hojení ran.

***Aktivita 5: Příprava polymerních nano-nástrojů umožňujících sledovat prostorové rozmístění membránových transportérů iontů a hormonů na buněčných membránách živočišných i rostlinných buněk současně elektronovou i fluorescenční konfokální mikroskopií.***

***Vedoucí aktivity:*** RNDr. Petr Štěpánek, DrSc.

Za tímto účelem budou protilátky proti těmto membránovým proteinům konjugovány pomocí polymerního linkeru s polymerem biokompatibilizovanou kvantovou tečkou na bázi CdSe/CdTe. Tato kvantová tečka je zobrazitelná jak opticky na základě fluorescenčních vlastností, tak elektronovou mikroskopií na základě elektronové hustoty respektive prvkového složení. Vazba na protilátku bude provedena oxidativním štěpením jodistanem a následnou reduktivní aminací za glykosylační místo, případně za thiol po redukcí tris(karboxymethyl)fosfinem (v obou případech jde o vazbu plně zachovávající vazebné místo protilátky nedotčené). Tato konjugace bude kombinována se značením protilátek nanočásticemi zlata, stříbra a palladia různých velikostí a tvarů umožňující takto rozlišit na elektronové mikroskopii více značek od sebe najednou v jednom vzorku.

Elegantní alternativou bude použití chimérických proteinů, kde bude vytvořen protein kombinující protilátku s příslušnou vazebnou aktivitou s proteinem silně chelatujícím příslušný kov sloužící jako značka pro elektronovou mikroskopii (transferrin chelatující kromě železa zejména Ga, Zr respektive Hf, fytochelatinu respektive metalothioneiny chelatující Cd) a fluorescenčním proteinem GFP, umožňujícím simultánní sledování fluorescencí.

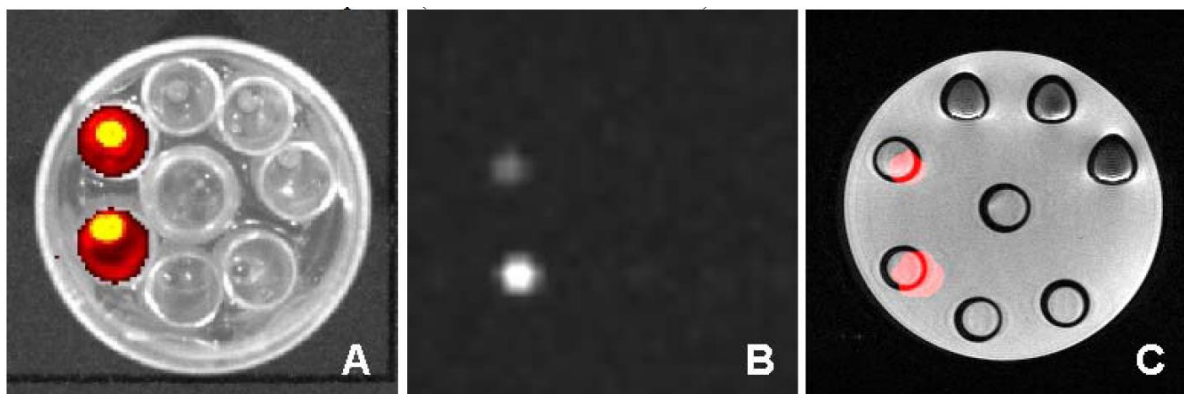
**Milníky:** Soubor polymerních nano-nástrojů umožňujících sledovat prostorové rozmístění membránových transportérů iontů a hormonů na buněčných membránách živočišných i rostlinných buněk současně elektronovou i fluorescenční konfokální mikroskopií.

**Aktivita 6:** Vývoj fluorofilních nanočástic, které budou v rámci projektu sloužit jako  $^{19}\text{F}$ -MRI kontrastní látky umožňující kombinovat zobrazení magnetickou rezonancí (MRI) s elektronovou mikroskopií.

**Vedoucí aktivity:** Ing. Daniel Jirák, Ph.D.

Pro přesné prostorové zobrazování měkkých tkání je mimořádně vhodná magnetická rezonance (MRI). Tato moderní neinvazivní zobrazovací diagnostická metoda je založena na měření signálu generovaného relaxací jaderného spinu protonu vody obsažené v tkáni. Při magnetické rezonanci se často jako kontrastní látky (přibližně ve 40 % případů) používají paramagnetika, která urychlují relaxaci spinů okolních protonů vody a tím zvyšují intenzitu signálu magnetické rezonance. Protože ale obecně platí, že vodu obsahují všechny tkáně, nehomogenní pozadí obvykle zhoršuje přesnost detekce. Tento problém lze vyřešit použitím jiných izotopů než  $^1\text{H}$ . Jako vhodné se jeví kontrastní látky na bázi fluoru  $^{19}\text{F}$ . Fluor (přírodní monoizotop  $^{19}\text{F}$ ) má rezonanční kmitočet blízký kmitočtu vodíku a pro jeho detekci tedy mohou být použity běžné komerčně vyráběné skenery; stačí provést relativně drobné hardwarové a softwarové změny (obvykle stačí, aby se radiofrekvenční cívka naladila na frekvenci fluoru a provedla se jednoduchá úprava sekvence). Jádro  $^{19}\text{F}$  vykazuje srovnatelně vysokou citlivost jako vodík. Navíc, vzhledem k téměř nulové koncentraci fluoru v živých organismech, se na snímcích nebo spektrech pořízených s použitím fluoru nevyskytuje žádné pozadí, a proto je možná absolutní kvantifikace množství atomu fluoru ve vzorku. Přestože lokální koncentrace fluorovaného kontrastního činidla může být velmi vysoká (perfluorované sloučeniny jsou často biologicky zcela inertní), je nutné hledat cesty, jak zlepšit citlivost detekce fluoru.

Nízký, ale vysoce specifický signál fluoru získaný při nižším rozlišení může být vhodně doplněn a kombinován s anatomickými snímky s vysokým prostorovým rozlišením pořízených pomocí protonové magnetické rezonance, případně i dalšími metodami jako je například fluorescence. Příklad kombinovaného zobrazování pomocí  $^{19}\text{F}$  magnetické rezonance s fluoresceinovou sondou z naší laboratoře je vidět na obrázku 5.2.2.



**Obrázek 5.2.2:** Zobrazení 300 Langerhansových ostrůvků. Optické zobrazení *in vitro* (A), magnetická rezonance pomocí izotopu  $^{19}\text{F}$  (B) a kombinace zobrazení pomocí  $^{19}\text{F}$  a  $^1\text{H}$  MRI (C) ze dvou vzorků s fluoresceinovou sondou (dvě zkumavky: na levé straně – snímek 300 Langerhansových ostrůvků označených fluorovým kontrastním činidlem, 2: referenční látka (inkubační médium s koncentrací 163 mM fluoru) a kontrolní zkumavky).

Vývoj samoorganizovaných struktur blokových kopolymerů, jejichž různé bloky jsou za vhodných podmínek schopny se oddělovat v nemísitelných fázích, prokázaly velký potenciál při vzniku nejrůznějších požadovaných nanostruktur, a to jak dvojrozměrných, tak trojrozměrných. To přirozeně vede ke zkoumání fyzikálních a biofyzikálních aspektů samoorganizovaných polymerních materiálů, protože samoorganizace je vůdčím principem mnoha biofyzikálních činností a struktur (biologické membrány, multienzymové komplexy atd.).

Je-li jeden z bloků těchto blokových kopolymerů rozpustný ve vodě, takové makromolekuly nazýváme amfifilními. Amfifilní blokové kopolymery jsou široce studovány z důvodu jejich schopnosti tvořit organizované agregáty ve vodném roztoku a různé mikrofázově oddělené morfologie v objemu hmoty. Takové agregáty mohou být použity například jako systémy pro dopravu léčivých substancí, jako nanoreaktory (micelární katalyzátory) apod.

V poslední době byly vyvinuty nové kopolymery, které jsou složitější než konvenční amfifily – obsahují navíc jeden fluorofilní blok (tj. blok s větším množstvím fluorových atomů – „perfluorovaný“), a tím takový polymer nese třetí nesmísitelnou makromolekulární doménu: fluorofilní (perfluoroalkylová) fáze je nesmísitelná jak s hydrofilními, tak s hydrofobními (lipofilními) bloky. Pro takové sloučeniny zavádíme jiný název, a sice „polyfily“; takto se nazývají látky, které se skládají z hydrofilních, lipofilních a fluorofilních skupin. Samoorganizované agregáty polyfilů tak umožní např. kombinovat biokompatibilizující a koloidně stabilizující účinek hydrofilního bloku kopolymeru s možností inkorporovat léčivo nebo hydrofóbně fluorescenční značku do hydrofobních domén a zároveň možnosti zobrazit celý systém pomocí  $^{19}\text{F}$  MRI díky fluorofilním blokům.

Veškeré fluorofilní nanočástice budou v rámci projektu sloužit jako  $^{19}\text{F}$  MRI kontrastní látky umožňující kombinovat tuto modalitu zobrazení s elektronovou mikroskopií (inherentně kontrastní díky přítomnosti atomů fluoru) i fluorescencí (po zabudování fluorescenční značky).

***Milníky: Fluorofilní nanočástice sloužící jako základ pro multimodální zobrazení v biologických systémech.***

## ***Výzkumný cíl 2: Rozpustné a supramolekulární systémy citlivé na oxidativní stres a přítomnost reaktivních forem kyslíku pro dopravu biologicky aktivních substancí do cílových buněk a buněčných kompartmentů***

Tato problematika tématicky navazuje na výzkumný cíl 1 týkající se oxidativního poškození radiací, které je z velké části dané právě reaktivními formami kyslíku generovanými při ozáření. Cílem je vývoj nanočásticového systému pro cílenou dopravu a řízené uvolňování částic citlivých na vnější koncentraci reaktivních forem kyslíku. Nanočástice reagující na změny prostředí jsou velmi vhodné jako nosiče pro aplikace v nanomedicíně při diagnóze a terapii četných onemocnění. Tento výzkum tak přispěje k vytvoření koncepčně nové dopravní „drug delivery“ platformy založené na biodegradovatelných polymerních nanočásticích reagujících na specifické vlastnosti vnějšího prostředí směřované na zánětlivé a maligní tkáně. Tyto dva typy tkání typicky produkují řádově vyšší koncentrace reaktivních forem kyslíku, například superoxidu nebo peroxidu vodíku. Nově připravené a studované nanočástice budou navrženy tak, aby degradovaly a uvolňovaly biologicky aktivní složky v přítomnosti reaktivních forem kyslíku v biologicky relevantních koncentracích. Tento systém bude zároveň použitelný jako nosič antioxidantů zapnutelný oxidativním stresem způsobeným ozářením elektronovým svazkem (ochrana biologického vzorku při ozáření).

Vezmeme-li v úvahu výše zmíněné polymery podléhající oxidaci, patří k jednoduchým způsobům přípravy polymerních systémů citlivých na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomocí štěpení sloučenin esteru kyseliny borité nebo pomocí tvorby oxalátových vazeb. Boronové esterové sloučeniny a oxalátové vazby mohou být zabudovány do motivů polymerních nanočásticových konstrukcí a štěpení pak vede k degradaci hlavního řetězce polymeru a následnému uvolnění nákladu. Při této strategii mohou být uvolněna drobná hydrofobní chemoterapeutická činidla poté, co byla vystavena biologicky relevantním oxidativním podmínkám, např. koncentracím H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pohybujícím se řádově mezi  $\mu$ M a mM. Tkáňově specifický transport léčiv nesoucích boronové skupiny (např. bortezomibu) může být uskutečněn pomocí užití monomerů metabolitů, které jsou běžně přítomny v lidském metabolismu, s cílem biodegradovatelné/biokompatibilních nanočástice reagující na reaktivní formy kyslíku. Nanočástice reagující na reaktivní formy kyslíku lze rovněž připravit za použití kurkuminu jako hlavního řetězce polymeru při reakci s oxalylchloridem, při níž se vytvoří oxalátové vazby reagující na reaktivní formy kyslíku. Kromě toho tvoří kurkumin za přítomnosti bortezomibu komplex, který může být využit pro aplikace transportu léčiv, v souvislosti se synergickými účinky *in vivo*.

**Výzkumný cíl 2 obsahuje celkem 3 aktivity zaměřené na vývoj o funkční testy nanočástic citlivých na reaktivní formy kyslíku.**

#### ***Aktivita 1: Syntéza polymerních nanočástic***

***Vedoucí aktivity:*** Mgr. Martin Hrubý, Ph.D.

Polymery a jejich nanočástice budou připraveny nanoprecipitací. Zde je jeden z příkladů: polymery (a dopravovaná látka – nilská červeň (NČ) nebo chemoterapeutická léčiva – palitaxel, popř. jiná) se nejprve metodou nanoprecipitace rozpustí ve vhodném rozpouštědle mísitelném s vodou, umístěny do injekční stříkačky a vstříknuty do vody/PBS programovatelnou pumpou. Polymer podstoupí řízené srážení ve vodě, což vede k tvorbě nanočástic. Organická rozpouštědla se pak odstraní odpařením za sníženého tlaku a/nebo dialýzou. Analogické nanočástice nesoucí ekvivalentní množství nilské červeně budou připraveny jako nanočástice nereagující na reaktivní formy kyslíku a vyrobeny ze známého polyesteru PLGA schváleného FDA s podobnou molekulovou hmotností, jako mají syntetizované polymery. Nilskou červeň jsme zvolili, protože se jedná o hydrofobní barvivo a často se používá pro modelování hydrofobních léčiv, s tou výhodou, že je fluorescenční pouze tehdy, pokud se ocitne v kontaktu s hydrofobním prostředím (jádro částic), protože fluorescence nilské červeně je v hydrofilním prostředí (buňky a okolí) zhaslá. Stručně řečeno, nilská červeň se používá jako model léčiva a současně jako fluorescenční sonda.

***Milníky: Polymerní nanočástice.***

#### ***Aktivita 2: Tvorba a vlastnosti připravovaných nanočástic.***

***Vedoucí aktivity:*** RNDr. Petr Štěpánek, DrSc.

Samouspořádání nanočástic ve vodných roztocích za simulovaných fyziologických podmínek bude studováno pomocí metod statického, dynamického a elektroforetického rozptylu světla a malouhlovým rozptylem rentgenového záření. Studium se zaměří na schopnosti polymerních struktur reagovat vnější koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS) jako je peroxid vodíku (relevantní fyziologickým a patologickým úrovním). Rovněž bude studována stabilita respektive rozložitelnost nanočástic v biologickém prostředí. Dále budou hodnoceny následující charakteristiky nanočástic: Hmotnostně střední molekulová hmotnost (určení agregačního čísla a hustoty respektive porozity - důležité pro dopravu léčiv); druhý viriální koeficient (charakteristika interakce nanočástic s rozpouštědlem, důležité pro koloidní

stabilitu systému); gyrační a hydrodynamický poloměr a jejich poměr charakterizující vnitřní strukturu ( $\rho = R_G / R_H$ );  $\zeta$ -potenciál (důležitý z hlediska koloidní stability stabilizací povrchovým nábojem a kvůli adsorpci krevních proteinů); disperzita (šířka distribuce velikostí nanočástic) a degradační chování *in vitro*. Použití rozptylových metod poskytne soubor údajů vhodných pro plnou charakterizaci nanočástic na supramolekulární a molekulární úrovni. Zobrazovací techniky elektronové mikroskopie (TEM a kryo-TEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM) budou použity pro charakterizaci těchto nanočástic na začátku i v průběhu degradace.

Degradační produkty nanočástic budou stanoveny pomocí SEC a NMR experimentů pro ověření degradačního mechanismu při kontaktu s biologickým prostředím obsahujícím ROS. Účinnost enkapsulace a uvolňování léčiv bude stanovena fluorescenční korelační spektroskopie a HPLC.

**Milníky: Úplný soubor fyzikálně-chemických charakterizačních dat o polymerních nanočásticích.**

### **Aktivita 3: Biologické vyhodnocení nanočástic**

**Klíčová osoba:** Doc. RNDr. Dušan Cmarko, CSc.

Cytotoxicita nově připravených nanočástic bude vyhodnocována pomocí tetrazoliové (MTT) kolorimetrické zkoušky pro ověření buněčného růstu a chemosenzivity. Nanočástice budou testovány po inkubaci s normálními buňkami (makrofágy a lidskými fibroblasty) a po inkubaci s rakovinnými buňkami (HeLa a PC-3).

Pro určení schopnosti připravených nanočástic uvolňovat bioaktivní látky v reakci na fyziologicky odlišný relevantní zdroj reaktivních forem kyslíku (nádor nebo zánět) porovnáme množství intracelulárního barviva NČ uvolněného z nanočástic nesoucích NČ v aktivovaných (tj. vyznačujících se nadprodukcí reaktivních forem kyslíku) a neaktivovaných makrofázích na základě vymizení fluorescence NČ v přítomnosti  $H_2O_2$ , popřípadě v přítomnosti molekuly generované reaktivními formami kyslíku v zánětu, v nádorových buňkách (PC-3 a HeLa buňkách) nebo v obou těchto typech buněk pomocí výše popsanych metod.

Nanočástice nesoucí barvivo NČ vystaveny rozmezí koncentrací (0 až 3,3 % obj.)  $H_2O_2$ . Intenzita fluorescence NČ bude sledována na 96-jamkové destičce za použití čtečky mikrodestiček. Uvolňování barviva v důsledku oxidace a destabilizace zkoumaných systémů bude hodnoceno v průběhu času na základě vymizení fluorescence NČ.

Tyto experimenty se budou provádět za použití molekuly, o níž je známo, že vytváří superoxid, oxid dusnatý a peroxyinitrit, SIN-1 (Sigma-Aldrich). Nanočástice nesoucí barvivo NČ budou vystaveny rozmezí koncentrací SIN-1 (1-100 mM). Uvolňování NČ barviva bude kvantifikováno tak, jak je to popsáno výše pro experimenty s  $H_2O_2$ . Na základě uvolňování NČ barviva bude možné kvantifikovat rychlost degradace polymerních nanočástic.

Nanočástice nesoucí barvivo NČ budou inkubovány s rakovinnými buněčnými liniemi PC-3 a HeLa (prostředí bohatého buněčného producenta reaktivních forem kyslíku) v různých časech inkubace. Intenzita fluorescence NČ bude sledována na 96-jamkové destičce za použití čtečky mikrodestiček. Uvolňování barviva v důsledku oxidace a destabilizace zkoumaných systémů bude hodnoceno v průběhu času na základě vymizení fluorescence NČ. Ztráta fluorescence pro každý vzorek v každém inkubačním čase bude porovnána s fluorescenční hodnotou ze vzorků inkubovaných s buněčnými liniemi makrofágů jako negativní porovnání podle výše uvedené metody.

Abychom mohli sledovat vnitrobuněčnou dopravu nanočástic, budou buňky (rakovinné i nerakovinné) inkubovány s barvivem LysoTracker za účelem označování lyzozomů a následně inkubovány s nanočásticemi nesoucími barvivo NČ. Bude stanovena kolokalizace nanočástic

v buněčných kompartmentech označených pomocí LysoTrackeru. Výsledky budou vyhodnoceny tak, že se lysozomy označují dextransu texaské červeně (10,000 kDa).

Všechny řady výše uvedených experimentů budou provedeny tak, že se jako reference použije protějšek nereagující na reaktivní formy kyslíku s ekvivalentním množstvím nanočástic PLGA nesoucích barvivo NČ.

Cytotoxicita nanočástic bude testována po inkubaci s normálními buňkami (makrofágy a lidskými fibroblasty) a po inkubaci s rakovinnými buňkami (HeLa a PC-3) a aktivovanými makrofágy (model zánětu). Dále budou testovány nanočástice založené na kyselině borité a nesoucí chemoterapeutický paclitaxel (rakovinný model) nebo protizánětlivý lék dexamethason (model zánětu, nový přístup). Nanočástice založené na kurkumin oxalátu doplněné o bortezomib budou testovány na rakovinném modelu a nanočástice založené na kurkumin oxalátu nesoucí dexametazon na modelu zánětu.

Paclitaxel bude použit proto, že jde o lék klinicky užívaný k léčbě rakoviny vaječníků, prsu, plic a slinivky. Navíc byl paclitaxel nesený micely již schválen v Koreji pro primární léčbu metastazující nebo rekurující rakoviny prsu, pro sekundární léčbu metastatického karcinomu prsu po selhání standardní chemoterapie a pro primární léčbu lokálně pokročilého nebo metastazujícího malobuněčného karcinomu plic. Bortezomib (Velcade®) je schválen pro léčbu relapsu mnohočetného myelomu a lymfomů plášťových buněk, neboť jde o vysoce účinné chemoterapeutikum (dávka u lidí ~ 1,3 mg / m<sup>2</sup>). Bortezomib může být kvůli synergickému účinku doplněn kurkuminem, nicméně tento přístup nebyl představen jako polymer na bázi kurkuminu, což by potenciálně mohlo zvýšit chemoterapeutické účinky. Dexametazon se používá k léčbě mnoha zánětlivých stavů a navíc se užívá i k léčbě pacientů s rakovinou podstupujících chemoterapii, aby se předešlo určitým vedlejším účinkům protinádorové léčby.

Polymerní nanočástice budou poskytnuty k biologickému testování na *in vivo* zvířecích modelech jak v rámci IKEM, tak na pracovišti strategického partnera (1. LF UK), tyto testy však nejsou součástí tohoto projektu.

***Milníky: Úplný soubor biologických charakterizačních dat o polymerních nanočásticích.***

### ***Výzkumný cíl 3: Dynamika buněčného jádra a možnosti dopravy biologicky aktivních substancí do a z něj. Studium struktury a regulace chromatinu.***

Cílem navrhovaného projektu bude identifikace a charakterizace nových faktorů podílejících se na regulaci a strukturně-funkční organizaci chromatinu v průběhu procesu diferenciaci.

#### ***Aktivita 1: Charakterizace RNA molekul nacházejících se v komplexu s mediátory Wnt a Shh signalizace.***

***Vedoucí aktivity: Doc. RNDr. Dušan Cmarko, CSc***

Pomocí metody RIP-seq a protilátek proti jaderným mediátorům Wnt a Shh signální dráhy (beta-katenin, Tcf/Lef a Gli proteiny) identifikujeme RNA molekuly nacházející se v komplexu s těmito proteiny v embryonálních kmenových (ES) buňkách. Svoji pozornost zaměříme zejména na dlouhé nekódující RNA (lncRNA). Vazba mezi nově identifikovanými lncRNA a jadernými mediátory Wnt a Shh signalizace bude potvrzena pomocí metod RIP a RNA pull down. U vybraných nově identifikovaných partnerů bude analyzována jejich jaderná lokalizace pomocí světelné a elektronové mikroskopie. Budeme studovat závislost kolokalizace v buněčném jádře a tvorby komplexů na aktivitě Wnt a Shh signální dráhy použitím známých agonistů a antagonistů těchto drah. Tyto látky budou použity jednak přímo,

ale i jako součást nanočástic (SUPRAMOL ÚMCH). Dále budeme analyzovat vybrané interakce a úroveň transkripce nově identifikovaných lncRNA molekul v průběhu diferenciaci ES buněk do nervových progenitorů. Svoji pozornost také zaměříme na identifikaci dalších proteinů nacházejících se v komplexu s nově identifikovanými lncRNA molekulami.

**Milníky: Identifikace a charakterizace nových faktorů regulujících strukturu chromatinu.**

#### **Aktivita 2: Charakterizace mutantních buněk postrádající nově identifikované lncRNA**

**Vedoucí aktivity:** Doc. RNDr. Dušan Cmarko, CSc

Tato aktivita přímo navazuje na aktivitu 1 tohoto cíle. Pomocí metody CRISPR/Cas9 vytvoříme mutantní embryonální kmenové buňky postrádající vybrané nově identifikované lncRNA partnery jaderných mediátorů Wnt a Shh signálních drah. Provedeme fenotypovou analýzu mutantních buněk a budeme sledovat jaký vliv má absence vybraného faktoru na expresi cílových genů kanonické Wnt signalizace za prvé pomocí Q-RT-PCR analýzy pro vybrané známe cílové geny kanonické Wnt signalizace a za druhé vytvořením a analýzou RNA-seq transkripčního profilu mutantních a zdravých buněk. Budeme také sledovat jaký vliv má odstranění nově identifikovaného regulačního faktoru na diferenciaci ES buněk a jejich ultrastrukturu.

**Milníky: Identifikace a charakterizace nových faktorů regulujících strukturu chromatinu.**

#### 5.2.4. Mezinárodní spolupráce

Při řešení výzkumných cílů budou pracovníci ZRIR IKEM spolupracovat s v rámci již ustavených spoluprací nových členů týmu přicházejících z 1. LF UK. Jedná se zejména o Technickou Univerzitu v Darmstadte, kde hlavní cíl dosavadní spolupráce byl stanovení vysokorozoluční struktury replikačních míst v jádře pomocí široké škály mikroskopických metod (viz dopis na podporu od Prof. C. Cardoso, příloha 6). Dále se jedná o Univerzitu v Osle (viz dopis od Prof. G. Griffithse, příloha 6). Laboratoř Prof. Griffithse se dlouhodobě zabývá studiem molekulárních sond a nanočástic jako nosičů různých biologicky aktivních látek za využití různých zvířecích modelů. Zkušenosti a vybavení laboratoří Prof. Cardoso a Griffithse jsou komplementární k laboratořím členům předkládaného projektu.

Pracoviště IKEM má dále zavedenou spolupráci s řadou zahraničních laboratoří v rámci mezinárodních projektů, jako je European Network for Cell Imaging and Tracking Expertise project (ENCITE). V současné době toto pracoviště aktivně spolupracuje s Dr. O. Bieri, University of Basel Hospital, od roku 2004 s UOB (Prof. Thorsen). MR skupina rovněž úzce spolupracuje s Centrem MR Excellence ve Vídni (Dr. S. Trattnig), E. Moser). Tyto spolupráce jsou doloženy společnými publikacemi.

Tým VaV centra SUPRAMOL ÚMCH AV ČR dále spolupracuje s výzkumnými centry na University of Minnesota, Minneapolis, USA; Commissariat a l'Énergie Atomique, Saclay, France; University of Science and Technology, Hefei, China; University of Oslo, Norway; University of Ghent, Belgium (viz dopis na podporu od Prof. R. Hoogenbooma, příloha 6); University of Antwerp, Belgium; Helmholtz centrum Rossendorf, Germany (viz dopis na podporu od Dr. Holger Stephana, příloha 6); Technical University of Munich, Germany; CNRS Bordeaux, France; Institut Pluridisciplinaire de Recherches sur les Materiaux, Pau, France; University of Bahia Blanca, Argentina.

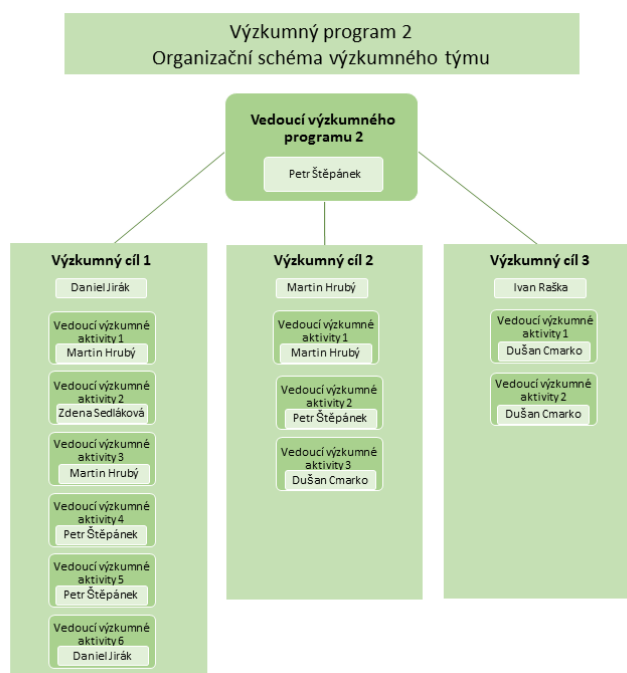
Mezinárodní pověst týmu je také zřejmá ze skutečnosti, že si ho vybralo devět zahraničních studentů pro jejich doktorská studia nebo roční postgraduální stáž (dva z nich

jako samoplátce) a tým také hostil profesora T. Seeryho z University of Connecticut, USA během části svého sabatiku.

### 5.2.5. Výzkumný tým

#### **Složení výzkumného týmu, role, výzkumné aktivity a harmonogram náboru**

Výzkumný tým Výzkumného programu 2 se skládá ze členů laboratoří R&D center SUPRAMOL ÚMCH a ZRIR IKEM a několika nově přijatých výzkumných pracovníků. Jak je znázorněno ve formě organizačního schématu tohoto výzkumného programu (Obr. 5.2.3), výzkumné činnosti podrobně popsané v kapitole 5.2.3 jsou přiřazeny k jednotlivým odpovědným výzkumníkům. Každá výzkumná činnost se bude provádět s přímou odpovědností vedoucího výzkumného programu. Sumarizace jmenovaných členů týmu, jakož i členů, kteří budou nominováni na dobu řešení projektu je uvedena v tabulce 5.2.1 spolu s jejich rolí v projektu, H-indexem a FTEs (full time equivalents). Kromě toho pro všechny seniorské nominované členy týmu uvedeny v příloze 7 jejich životopisy. Tyto životopisy shrnují odbornosti členů týmu, jejich nejlepších 8 publikací v oblasti výzkumu navrhovaného projektu a další relevantní informace (viz příloha 7).



**Obrázek 5.2.3: Organizační schéma výzkumného týmu výzkumného programu 2.** Vedoucí výzkumného programu bude odpovědný za koordinaci aktivit ve třech výzkumných cílech. Vedoucí výzkumných aktivit budou přímo odpovědní vedoucímu výzkumného programu.

**RNDr. Petr Štěpánek, DrSc., excelentní pracovník (2017-2022),** bude zodpovědný za výzkumný cíl 1 (supervise aktivit 4 a 5) a Výzkumný cíl 2 (supervise aktivity 2) a bude také členem týmu pracujícím na dalších aktivitách výzkumných cílů 1 a 2. Kromě koordinačních činností a psaní publikací se bude podílet na fyzikálně-chemické charakterizaci nanočásticových systémů za využití pokročilých rozptylových technik na partnerské instituci ÚMCH. Bude mít rovněž na starosti spolupráci s IKEM ve vývoji MRI kontrastních látek. Jeho odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).



**Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc., klíčový pracovník (2017-2022)**, nově přijatý na projekt, bude odpovědný za aktivitu 3 cíle 2 a aktivity 1 a 2 výzkumného cíle 3. Bude dohlížet na plánování experimentů, vyhodnocování výsledků, publikační aktivitu i obsazování navrhovaných pracovníků. Rovněž bude zodpovědný za spolupráci se zahraničními laboratořemi, zejména laboratoří C. Cardoso, G. Griffiths. Jeho odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., klíčový pracovník (2017-2022)**, bude zodpovědný za výzkumný cíl 1 (supervise aktivit 1 a 3) a výzkumný cíl 2 (supervise aktivity 1) a bude také členem týmu pracujícím na dalších aktivitách výzkumných cílů 1 a 2. Bude zodpovědný za organickou a polymerní syntézu a bude koordinovat experimenty v rámci těchto aktivit na partnerské instituci ÚMCH. Jeho odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**Ing. Daniel Jiráček, Ph.D., klíčový pracovník (2017-2022)**, bude odpovědný za výzkumný cíl 1 a v něm za aktivitu 6, též bude aktivní v dalších aktivitách výzkumného cíle 1 a 2. Vedle koordinační a literární činnosti povede pracovní skupinu se zaměřením na zobrazování vzorků pomocí magnetické rezonance a optického zobrazování. Jeho odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**RNDr. Zdena Sedláková, CSc., klíčový pracovník (2017-2022)**, bude zodpovědná za Výzkumný cíl 1 (supervise aktivity 2) a bude též členem týmu pracujícím na dalších aktivitách výzkumných cílů 1 a 2. Bude zodpovědná za studium vlastností antioxidačních materiálů a jejich účinnosti a degradační studium materiálů v důsledku oxidativního stresu na partnerské instituci ÚMCH. Její odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**Doc. RNDr. Dušan Cmarko, Ph.D., vědecký pracovník - senior (2017-2022)**, bude pod vedením prof. Rašky odpovědný za aktivitu 3 v rámci výzkumného cíle 2 a za aktivitu 1 a 2 cíle 3. Bude zaměřen na dynamiku nano- a mikročásticových systémů a na objasnění nových faktorů podílejících se na strukturně-funkční organizaci chromatinu v živočišných/savčích buňkách. Bude zodpovědný za plánování a provádění experimentů zejména v rámci moderních metod elektronové mikroskopie, za analýzu a prezentaci získaných dat a psaní manuskriptů. DC získal rozsáhlé zkušenosti v dané problematice zejména během dlouhodobého postdoktorandského pobytu na Univerzitě v Lausanne. DC jako hlavní řešitel koordinoval tři projekty GAČR a jak člen týmu se zúčastnil řady zahraničních projektů. Jeho odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**RNDr. Jan Kučka, Ph.D., vědecký pracovník - senior (2017-2022)**. Je radiochemik, který bude provádět experimenty na radiační poškození a vyhodnocení in situ dozimetrie na partnerské instituci ÚMCH AVČR v rámci výzkumných cílů 1 a 2. Jeho odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**Ing. Jiří Pánek, Ph.D., vědecký pracovník - senior (2017-2022)**. Bude odpovědný za fluorescenční mikroskopii připravených materiálů na partnerské instituci ÚMCH AVČR v rámci výzkumných cílů 1 a 2. Jeho odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**Ing. Lenka Poláková, Ph.D., vědecký pracovník - junior (2017-2022)**. Bude studovat antioxidační vlastnosti polymerů a bude odpovědná za část syntézy polymerů na partnerské instituce ÚMCH AVČR v rámci výzkumných cílů 1 a 2.

**Mgr. Rafal Poreba, Ph.D., vědecký pracovník - junior (2017-2022)**. Bude odpovědný za část studia antioxidačních vlastností polymer a charakterizaci polymerních materiálů na partnerské instituci ÚMCH AVČR v rámci Výzkumných cílů 1 a 2.

**Mgr. Zdeňka Syrová, Ph.D., vědecký pracovník - junior (2017-2022)**. Bude odpovědná za aktivitu 3 v rámci výzkumného cíle 2 a za aktivitu 1 a 2 cíle 3. Bude se věnovat zobrazování vzorků zejména světelnou mikroskopií. Bude spoluzodpovědná za experimenty sledující

interakci nanočástic se živými savčími buňkami. Její výzkum je zaměřen na nanomedicínu a regenerativní medicínu, kde se uplatňuje využití nanomateriálů jako nosičů terapeutických agens nebo buněk. Prošla výcvikem v zahraničních laboratořích v oblasti regenerativní medicíny a kmenových buněk a několik let působila vědecky v tomto oboru. Jako leader vědecké skupiny pak svoji odbornost dále rozvíjela v oblasti studia interakce buněk s nanovláknými strukturami. Její odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**Ing. Tomáš Vacík, Ph.D Ph.D., vědecký pracovník - junior (2017-2022).** Bude odpovědný za aktivitu 3 v rámci výzkumného cíle 2 a za aktivitu 1 a 2 cíle 3. Bude zodpovědný za plánování a provádění zejména molekulárně biologických experimentů, analýzy a prezentace získaných dat a také za psaní publikací. Jeho odborný profil je detailně popsán v příloženém CV (Příloha 7).

**Mgr. Ondřej Sedláček, Ph.D., mladý vědecký pracovník (2017-2022).** Bude odpovědný za organickou a polymerní syntézu na partnerské instituci ÚMCH v rámci Výzkumných cílů 1 a 2.

**Mgr. Alessandro Jager, Ph.D., mladý vědecký pracovník (2017-2022).** Bude odpovědný za přípravu polymerních nanočástic a dalších nanonosičů včetně jejich charakterizace na partnerské instituci ÚMCH v rámci Výzkumných cílů 1 a 2.

**Mgr. Eliezer Jager, Ph.D., mladý vědecký pracovník (2017-2022).** Bude odpovědný za přípravu nanočástic a jejich charakterizaci na partnerské instituci ÚMCH v rámci Výzkumných cílů 1 a 2.

**Mgr. Mariia Rabyk, Ph.D., mladý vědecký pracovník (2017-2022).** Bude odpovědná za chemickou modifikaci a instrumentální charakterizaci polymerních materiálů na partnerské instituci ÚMCH v rámci Výzkumných cílů 1 a 2.

**Mgr. Andrea Gálisová, vědecký pracovník (2017-2022).** Bude odpovědná za aktivitu 6 výzkumného cíle 1. Bude se věnovat zobrazování vzorků pomocí magnetické rezonance.

**Mgr. Markéta Jiráťová, Ph.D., vědecký pracovník - junior (2017-2022).** Bude odpovědná za aktivitu 6 výzkumného cíle 1. Bude zajišťovat mimo jiné přípravu buněčných linií a in vitro experimenty (mikroskopie, cytotoxické testy aj.).

**Mgr. Miloslav Drobný, vědecký pracovník - junior (2017-2022).** Bude odpovědný za aktivitu 6 výzkumného cíle 1. Jeho hlavní pracovní náplní bude konstrukce radiofrekvenčních cívek pro experimenty prováděné na experimentálním tomografu a měření na 3T klinickém tomografu.

**Vědecký pracovník - junior, PhD student (2017-2022).** Bude nominován do týmu řešícího aktivitu 3 v rámci výzkumného cíle 2 a aktivitu 1 a 2 cíle 3. Bude se věnovat zobrazování vzorků zejména světelnou mikroskopií.

**Vědecký pracovník - junior, PhD student (2017-2022).** Bude nominován do týmu řešícího aktivitu 3 v rámci výzkumného cíle 2 a aktivitu 1 a 2 cíle 3. Bude se věnovat molekulárně biologickým experimentům.

**Vědecký pracovník - junior, PhD student (2017-2022).** Bude nominován do týmu řešícího aktivitu 3 v rámci výzkumného cíle 2 a aktivitu 1 a 2 cíle 3. Bude studovat strukturně-funkční organizaci chromatinu v živočišných/savčích buňkách.

**Vědecký pracovník - junior, PhD student (2017-2022).** Bude nominován do týmu řešícího aktivitu 6 výzkumného cíle 1. Bude konstruovat radiofrekvenční cívky pro experimenty prováděné na experimentálním tomografu.

**3 PhD studenti (2017-2022).** Budou se účastnit experimentální činnosti a analýzy dat na partnerské instituci ÚMCH AV ČR v rámci Výzkumných cílů 1 a 2.

**2 techničtí pracovníci (2017-2022).** Budou zajišťovat laboratorní servis pro týmy řešící výzkumné cíle 1 a 2 tohoto výzkumného plánu.

**Technický pracovník (2017-2022).** Bude zajišťovat laboratorní servis pro tým řešící aktivitu 6 výzkumného cíle 1 tohoto výzkumného plánu.

**Tabulka 5.2.1: Výzkumný tým výzkumného programu 2.** Viz text kapitoly 5.2.5 pro detailnější popis role jednotlivých pracovníků.

Jméno a příjmení	Pozice pracovníka	Role v týmu, příslušnost k výzkumné aktivitě	H-index	1.	2.	3.	4.	5.	6.
				rok	rok	rok	rok	rok	rok
				FTE v době realizace projektu					
Petr Štěpánek	Excelentní pracovník	Vedoucí VP2, vedoucí aktivit 4 a 5 cíle 1 a aktivity 2 cíle 2, supervize ostatních aktivit cíle 1 a 2	30	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Ivan Raška	Klíčový pracovník	Člen VP2, supervize aktivity 3 cíle 2, supervize aktivit 1, 2 cíle 3	31	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Martin Hrubý	Klíčový pracovník	Člen VP2, vedoucí aktivit 1 a 3 cíle 1 a aktivity 1 cíle 2, supervize ostatních aktivit cíle 1 a 2	17	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Daniel Jirák	Klíčový pracovník	Člen VP2, vedoucí aktivity 6 cíle 1, člen ostatních aktivit cíle 1 a 2	16	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Zdena Sedláková	Klíčový pracovník	Člen VP2, vedoucí aktivity 2 cíle 1, člen ostatních aktivit cíle 1 a 2	16	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Dušan Cmarko	Pracovník - senior	Člen VP2, vedoucí aktivity 3 cíle 2, vedoucí aktivit 1, 2 cíle 3	14	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Jan Kučka	Pracovník -senior	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	12	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Jiří Pánek	Pracovník - senior	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Lenka Poláková	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rafal Poreba	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Zdeňka Syrová	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivity 3 cíle 2, člen aktivit 1, 2 cíle 3	7	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Tomáš Vacík	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivity 3 cíle 2, člen aktivit 1, 2 cíle 3	8	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Ondřej Sedláček	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Alessandro Jager	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivit cíle 1, 2 a 3	10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eliezer Jager	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivit cíle 1, 2 a 3	14	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mariia Rabyk	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

**Tabulka 5.2.1 - pokračování**

Jméno a příjmení	Pozice pracovníka	Role v týmu, příslušnost k výzkumné aktivitě	H-index	1.	2.	3.	4.	5.	6.
				rok	rok	rok	rok	rok	rok
				FTE v době realizace projektu					
Andrea Gálisová	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivity 6 cíle 1	2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Markéta Jiráťová	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivity 6 cíle 1	0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Miloslav Drobný	Pracovník - junior	Člen VP2, člen aktivity 6 cíle 1	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Bude nominován	Pracovník - junior, PhD student	Člen VP2, člen aktivity 6 cíle 1	-	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Bude nominován	Pracovník - junior, PhD student	Člen VP2, člen aktivity 3 cíle 2, člen aktivit 1, 2 cíle 3	-	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Bude nominován	Pracovník - junior, PhD student	Člen VP2, člen aktivity 3 cíle 2, člen aktivit 1, 2 cíle 3	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bude nominován	Pracovník - junior, PhD student	Člen VP2, člen aktivity 3 cíle 2, člen aktivit 1, 2 cíle 3	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bude nominován	Pracovník - PhD student	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - PhD student	Člen VP2 člen aktivit cíle 1 a 2	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Pracovník - PhD student	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Technický pracovník	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Technický pracovník	Člen VP2, člen aktivit cíle 1 a 2	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Bude nominován	Technický pracovník	Člen VP2, člen aktivity 6 cíle 1	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

## **Výsledky klíčových a excelentních členů odborného týmu dosažené v letech 2011-2015**

### **RNDr. Petr Štěpánek, DrSc excelentní pracovník**

*5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. Giacomelli, Fernando C.; Stepanek, Petr; Giacomelli, Cristiano; Schmidt, Vanessa; Jaeger, Eliezer; Jaeger, Alessandro; Ulbrich, Karel, , pH-triggered block copolymer micelles based on a pH-responsive PDPA (poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate]) inner core and a PEO (poly(ethylene oxide)) outer shell as a potential tool for the cancer therapy, SOFT MATTER 2011, 7, 9316-9325, Citováno: 33
2. Angelov, Borislav; Angelova, Angelina; Filippov, Sergey K.; Narayanan, Theyencheri; Drechsler, Markus; Stepanek, Petr; Couvreur, Patrick; Lesieur, Sylviane, DNA/Fusogenic Lipid Nanocarrier Assembly: Millisecond Structural Dynamics, JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY LETTERS 2013, 4, 1959-1964 Citováno:: 31
3. Borisova, O.; Billon, L.; Zaremski, M.; Grassl, B.; Bakaeva, Z.; Lapp, A.; Stepanek, P.; Borisov, O., pH-triggered reversible sol-gel transition in aqueous solutions of amphiphilic gradient copolymers, SOFT MATTER, 2011, 7, 10824-10833 Citováno:: 29
4. Rodriguez-Emmenegger, C.; Jaeger, A.; Jaeger, E.; Stepanek, P.; Bologna Alles, A.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Brynda, E., Polymeric nanocapsules ultra stable in complex biological media, COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES, 2011, 83, 376-381 Citováno:: 25
5. Angelov, Borislav; Angelova, Angelina; Filippov, Sergey K.; Drechsler, Markus; Stepanek, Petr; Lesieur, Sylviane, Multicompartment Lipid Cubic Nanoparticles with High Protein Upload: Millisecond Dynamics of Formation, ACS NANO, 2014, 8, 5216-5226, Citováno:: 25

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel).*

1. GA ČR, 16-02870S, řešitel, „Co mohou společně vytvořit polysacharidy a peptidům příbuzné struktury? Samouspořádané biomimetické hybridní polymerní architektury.“ 2016-2018, celkem 5 296 tis Kč
2. Norské fondy, MŠMT 7F14009, řešitel (+ 3 partneři), „Makromolekulární stavebnice pro biomedicínální aplikace“, 2014-2016, celkem 25 548 tis. Kč
3. GA ČR, P304/12/0950, řešitel (+ 1 partner), „Chelatující polymery jako léčiva pro Wilsonovu nemoc“, celkem 11 411 tis. Kč
4. GA ČR, P208/10/1600, řešitel, „Polymerní částice a nanostrukturované materiály stabilizované povrchově aktivními molekulami“, 2010-2014, celkem 7 421 tis. Kč
5. MŠMT Kontakt, LH14079, řešitel, „Termoresponsivní polymerní katalytická depa: injikovatelné reaktory tvarované in situ pro biomedicínské aplikace“, 2014-2016, celkem 1 859 tis. Kč

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

1. Deutsche Institut fur Kautschuktechnologie, projekt „Charakterizace a analýza kaučukových emulzí“, řešitel, 2013-2014, 204 tis. Kč
2. Patentová přihláška, Mikročástice chemicky modifikovaných biopolymerů pro prevenci a zmírnění následků Wilsonovy choroby, 2015

**Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc., klíčový pracovník**

*5 nejvýznamnějších vědeckých publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. Juda P, Smigová J, Kováčik L, Bártová E, Raška I. Ultrastructure of cytoplasmic and nuclear inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 "rods and rings" inclusions. *J Histochem Cytochem.* 2014 Oct;62(10):739-50. (IF 1.959, počet citací WOS: 2)
2. Smirnov E, Borkovec J, Kováčik L, Svidenská S, Schröfel A, Skalníková M, Švindrych Z, Křížek P, Ovesný M, Hagen GM, Juda P, Michalová K, Cardoso MC, Cmarko D, Raška I. Separation of replication and transcription domains in nucleoli. *J Struct Biol.* 2014 Dec;188(3):259-66. (IF 3.231, počet citací WOS: 2)
3. Popov A, Smirnov E, Kováčik L, Raška O, Hagen G, Stixová L, Raška I. Duration of the first steps of the human rRNA processing. *Nucleus.* 2013 Mar-Apr;4(2):134-41. (IF 3.033, počet citací WOS: 5)
4. Křížek P, Raška I, Hagen GM. Flexible structured illumination microscope with a programmable illumination array. *Opt Express.* 2012 Oct 22;20(22):24585-99. (IF 3.14 počet citací WOS: 10)
5. Smigová J, Juda P, Cmarko D, Raška I. Fine structure of the "PcG body" in human U-2 OS cells established by correlative light-electron microscopy. *Nucleus.* 2011 May-Jun;2(3):219-28. (IF 3.033, počet citací WOS:14)

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel).*

1. 2014-2017, Spoluřešitel, Projekt MŠMT č. 7F14009, Česko-norský výzkumný program, Polymerní stavebnice pro biomedicínální aplikace, 5 552 tis Kč.
2. 2012-2018, Spoluřešitel, GAČR č. P302/12/G157, Projekty na podporu excelence v základním výzkumu, Dynamika a organizace chromosomů během buněčného cyklu a při diferenciaci v normě a patologii, 30 942 tis Kč.

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

V letech 2011-2015 nejsou žádné takové výsledky.

**Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., klíčový pracovník**

*5 nejvýznamnějších vědeckých publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. Sedláček, O., Monnery B., D., Filippov, S., Hoogenboom, R., Hrubý, M.: Poly(2-oxazoline)s - are they more advantageous for biomedical applications than other polymers? *Macromolecular Rapid Communications* (2012), 33(19), 1648-1662, IF = 4,929, Citace WOS: 69
2. Jäger, E., Höcherl, A., Janoušková, O., Jäger, A., Hrubý, M., Konefal, R., Netopilík, M., Pánek, J., Slouf, M., Ulbrich, K., Štčpánek, P.: Fluorescent boronate-based polymer nanoparticles

with reactive oxygen species (ROS)-triggered cargo release for drug-delivery applications. *Nanoscale* (2016), 8(13), 6958-6963, IF = 7,760, Citace WOS: 0

3. Sedláček, O., Hrubý, M., Studenovský, M., Větvička, D., Svoboda, J., Kaňková, D., Kovář, J., Ulbrich, K.: Polymer conjugates of acridine-type anticancer drugs with pH-controlled activation *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2012), 20(13), 4056-4063, IF = 2,903, Citace WOS: 18
4. V. V. Philimonenko, A. A. Philimonenko, I. Šloufová, M. Hrubý, F. Novotný, Z. Halbhuber, M. Krivjanská, J. Nebesářová, M. Šlouf: Simultaneous detection of multiple targets for ultrastructural immunocytochemistry. *Histochemistry and Cell Biology* (2014), 141(3), 229-239, IF = 2,780, Citace WOS: 7
5. M. Hrubý, S. Filippov, P. Štěpánek: Smart polymers in drug delivery systems on crossroads: which way deserves following? *European Polymer Journal* (2015), 65, 82-97, IF = 3,485, Citace WOS: 11

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel).*

1. Nová vícefázová nanodiagnostika pro zobrazování nádorových onemocnění a predikci efektivity antiangiogenní terapie, AZV, 16-30544A, řešitel, FINANCE (4 roky): 15972 000 Kč, UMCH 5806 000 Kč
2. Nová nádorová diagnostika na bázi glykogenu jako tělu vlastního nanostrukturovaného nosiče, AZV, 15-25781A, spoluřešitel, CELKEM 10601 000 Kč, UMCH 5093 000 Kč
3. Hybridní materiály založené na makrocyclických ligandech pro využití v medicíně, GAČR 13-08336S, spoluřešitel, FINANCE (4 roky): CELKEM 11928 000 Kč, UMCH 2852 000 Kč
4. Samouspořádané polymerní nanostruktury jako bimodální kontrastní látky pro zobrazení magnetickou rezonancí a ultrazvukem. GAČR 16-03156S, řešitel, CELKEM 8461 000 Kč, UMCH 2913 000 Kč
5. Produkce biodegradovatelných nanoléciv pro přesnou multimodální imunoterapii (PRECIOUS) Horizon 2020, H2020-NMP-2015-686089, spoluřešitel, FINANCE (3 roky): CELKEM 7000 000 EUR, UMCH 592 000 EUR

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

1. Český patent PV 2012-739: Podešva, J., Hrubý, M., Kovářová, J., Spěváček, J. Antioxidanty pro autostabilizované elastomerní polyurethany
2. Kučka, J., Hrubý, M., Studenovský, M., Větvička, D. Plastická hmota pro mobilní stínění zdrojů ionizujícího záření. Užitečný vzor, CZ 24789 U1, přihlášeno 6. 10. 2011 (2011-24932), zapsáno 10. 1. 2013. prodej licence
3. Patentová přihláška PV 2015-770: Hrubý, M., Vetrík, M., Kučka, J., Macková, H., Štěpánek, P., Mattová, J., Poučková, P., Urbánek, P. (2015) Polymer na bázi polysacharidu a jeho použití k prevenci a léčbě Wilsonovy choroby
4. Patentová přihláška PV 2016-117: Švec, P., Hrubý, M., Kučka, J., Sedláček, O., Štěpánek, P., Petřík, M., Nový, Z., Hajdúch, M. (2016) Jodovaná radioznačitelná analoga cholinu, jejich příprava a použití jako léčiva



5. Cígler, P., Hrubý, M., Kužel, S.: Směs prozvýšení produkce biologicky aktivních látek v rostlinách a její využití. Patent WO2005/118508 A2, 2005, prodej licence.

**Ing. Daniel Jiráček, Ph.D., klíčový pracovník**

*5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. Rehoř I, Vilímová V, Jendelová P, Kubíček V, Jiráček D, Herynek V, Kapcalová M, Kotek J, Cerný J, Hermann P, Lukeš I. Phosphonate-Titanium Dioxide Assemblies: Platform for Multimodal Diagnostic-Therapeutic Nanoprobes. *J Med Chem.* 2011 Jul 28; 54(14):5185-5194 IF<sub>2011</sub> 5.207, počet citací: 23 (WOS)
2. Kacénka M, Kaman O, Kotek J, Falteisek L, Cerný J, Jirák D, Herynek V, Zacharovova K, Berkova Z, Jendelova P, Kupcik J, Pollert E, Veverka P, Lukes I. Dual imaging probes for magnetic resonance imaging and fluorescence microscopy based on perovskite manganite nanoparticles. *J Mater Chem.* 2011, 21(1):157-164 IF<sub>2011</sub> 5.207, počet citací: 21 (WOS)
3. Deligianni X, Jiráček D, Berková Z, Hájek M, Scheffler K, Bieri O. In vivo visualization of cells labeled with superparamagnetic iron oxides by a sub-millisecond gradient echo sequence. *MAGMA.* 2014 Aug; 27(4):329-37 IF<sub>2014</sub> 2.869, počet citací: 3 (WOS)
4. Kačénka M, Kaman O, Kikerlová S, Pavlů B, Jiráček Z, Jiráček D, Herynek V, Černý J, Chaput F, Laurent S, Lukeš I. Fluorescent magnetic nanoparticles for cell labeling: Flux synthesis of manganite particles and novel functionalization of silica shell. *J Colloid Interface Sci.* 2015 Jun 1; 447:97-106 IF<sub>2015</sub> 3.368, počet citací: 4 (WOS)
5. Aasen SN, Pospisilova A, Eichler TW, Panek J, Hruby M, Stepanek P, Spriet E, Jirák D, Skaftnesmo KO, Thorsen F. A Novel Nanoprobe for Multimodal Imaging Is Effectively Incorporated into Human Melanoma Metastatic Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2015 Sep 8; 16(9):21658-80 IF<sub>2015</sub> 2.862, počet citací: 0 (WOS)

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel).*

1. Samouspořádané polymerní nanostruktury jako bimodální kontrastní látky pro zobrazení magnetickou rezonancí a ultrazvukem 16-03156S 2016-2018, celková finanční podpora: 8 461 000 Kč

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

V letech 2011-2015 nejsou žádné takové výsledky.

**RNDr. Zdena Sedláková, CSc., klíčový pracovník**

*5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. L. Poláková, V. Raus, L. Kostka, A. Braunová, J. Pilař, V. Lobaz, J. Pánek, Z. Sedláková: Antioxidant properties of 2-hydroxyethyl methacrylate-based copolymers with incorporated sterically hindered amine, *Biomacromolecules* (2015), 16(9), 2726-2734, IF = 5.750, Citace WOS: 0

2. F. Surman, T. Riedel, M. Bruns, N. Yu. Kostina, Z. Sedláková, C. Rodriguez-Emmenegger: Polymer brushes interfacing blood as a route toward high performance blood contacting devices. *Macromolecular Bioscience*. (2015) 15(5), 636-646, IF = 3.851, Citace WOS: 11
3. Rodríguez Emmenegger, C., Brynda, E., Riedel, T., Sedláková, Z., Houska, M., Bologna Alles, A.: Interaction of blood plasma with antifouling surfaces, *Langmuir* (2009)11, 6328-33, IF = 3.898, Citace WOS: 80
4. Nguyen N., H., Rodríguez Emmenegger, C., Brynda, E., Sedláková, Z., Percec, V.: SET-LRP of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide in H<sub>2</sub>O, *Polymer Chemistry* (2013) 4, (8), 2424-2427, IF = 5.368, Citace WOS: 25
5. Rodríguez Emmenegger, C., Schmidt B. V. K., J., Sedláková, Z., Šubr, V., Bologna Alles, A., Brynda, E., Barner-Kowollik, C.: Low temperature aqueous living/controlled (RAFT) polymerization of carboxybetaine methacrylamide up to high molecular weights, *Macromolecular Rapid Communications*. (2011) 32(13), 958-965, IF = 4.596, Citace WOS: 24

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel):*

1. Hemagel - další zlepšení léčebných vlastností obchodně úspěšného výrobku, 2012-2015, Co-investigator, TA ČR, Project number: TA02010141, Finance ÚMCH: 4 331 000 Kč, Finance projekt: 10 967 000 Kč
2. Syntéza a charakterizace biologicky aktivních povrchů připravených metodami řízených radikálových polymerizací a "click" chemií, 2012-2014, Principal investigator, GA ČR, Project number: P106/12/1451, Finance: 6 564 000 Kč
3. Polymery ultrarezistentní proti adsorpci proteinů pro biomedicínské aplikace syntetizované živou radikálovou polymerizací, 2013-2015, Principal investigator, MŠMT, Project number: LH13178, Peníze: 1 666 000 Kč

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

1. Přípravek pro orální použití CZ305391 (B6), 2015, Sedláková Z., Poláková L.
2. Orální přípravek PCT/CZ2015/050011, 2015, Sedláková Z., Poláková L.
3. A method of displaying of alphanumeric information KZ29766, 2015, Suleimenov I., Mun G., Sedlakova Z., Shaltykova D, Iglikov I.,
4. A method for reproducing images KZ29768, 2015, Suleimenov I., Sedlakova Z., Mun G., Shaltykova D., Semenyakin N.
5. A method of introducing of symbol information KZ29310, 2013, Suleimenov I., Z. Sedlakova, Mun G., Semenyakin N., Shaltykova D., Obukhova P., Panchenko S.

#### 5.2.6. Charakteristika pořizovaného klíčového vybavení/funkčních modelů

V následujících tabulkách jsou uvedeny požadované klíčové vybavení a funkční moduly, jejich pořizovací náklady a technická specifikace. Jednotlivě jsou uvedeny přístroje, zařízení a software nezbytné pro realizaci projektu ve vazbě na VP2. Jmenovitě jsou uvedeny všechny položky s pořizovací cenou 1 mil Kč (bez DPH) a vyšší. Položky s nižší hodnotou jsou sdruženy

do funkčních modulů, dle jejich povahy a provázanosti s konkrétní výzkumnou aktivitou VP2, ale též VP1 a VP3.

Požadované investice jsou též popsány podrobně v rozpočtu (příloha 8 a povinná příloha v systému MS2014+.), komentáři k rozpočtu (příloha 9) a jejich ceny podloženy soupisem jednotlivých cenových nabídek (příloha 10).

<b>Klíčové vybavení / funkční modul (seřadte dle ceny sestupně od nejvyšší)</b>	<b>Počet kusů položky</b>	<b>Plánovaná cena celkem bez DPH (tis. Kč)</b>
1. Funkční modul zařízení pro automatizované zamrazování biologických vzorků za vysokého tlaku.	1	8 450
<p><u>Charakteristické vlastnosti:</u> 2 zařízení pro automatizované zamrazování za vysokého tlaku a pro mrazovou substituci. Přístroj na zamrazování umožňuje zamražení velkých vzorků (do 5 mm) vhodných pro kryoultramikrotomii s následní kryo-elektronovou mikroskopií nebo pro mrazovou substituci a případnou imunoelektronovou mikroskopií.</p> <p><u>Účel pořizovaného vybavení:</u> Zařízení umožní díky své rychlosti vizualizovat velmi dynamické procesy či změny buněčných struktur v nanometrovém a milisekundovém rozlišení. Kryosubstituce je časově náročná metoda a automatický procesor zrychlí a zefektivní práci s přípravou vzorků v nízkých teplotách zejména pro imunoelektronovou mikroskopií. Procesor pro kryosubstituci doplní stávající kryosubstituční zařízení Leica EM AFS2. Proto budou tato zařízení využita zejména v rámci aktivit výzkumného cíle 3 tohoto VP, budou však sloužit i pro aktivity VP1 a VP3 využívající kombinací imunologických a nanočásticových přístupů pro elektronovou mikroskopií v rostlinných a živočišných buňkách (obr. 5.2.1).</p> <p><u>Připravenost infrastruktury:</u> Zařízení je možné instalovat do běžné laboratoře. Požadavek na média v podobě běžného rozvodu elektřiny je v navrhované místnosti ZRIR IKEM zajištěn.</p>		
2. Funkční modul zařízení pro syntézu monomerů, polymerů a nanočástic	1	5 210
<p><u>Charakteristické vlastnosti:</u> Blok zařízení pro syntézu monomerů a polymerů sestávající z následujících zařízení: mikrovlnný syntetizátor s řízením výkonu, možností sledovat teplotu v kvetě a automatickým měničem vzorků, odparka s vakuovou stanicí pro odpařování rozpouštědel, rtuťová výbojka pro fotochemické reakce, preparativní HPLC pro čištění připravených polymerů, FT-IR spektrometr pro sledování průběhu reakcí při přípravě a základní charakterizaci monomerů a polymerů a přípravu nanočástic z polymerů, sonikátor pro disperzi nanočástic a mikrofluidický čipový systém včetně plasmové pece.</p> <p><u>Účel pořizovaného vybavení:</u> Blok zařízení umožňuje připravit monomery, polymery a výborně definované nanočástice. Proto bude toto zařízení klíčové jak pro aktivity VP2, tak pro aktivity VP1 využívající nanočásticové systémy v rostlinných buňkách a aktivity VP3, které testují připravené nanočástice v novém uspořádání EREM (obr. 5.2.1).</p> <p><u>Připravenost infrastruktury:</u></p>		

Zařízení je možné instalovat do běžné chemické laboratoře, předpokládá se instalace v místnosti č. 809 ÚMCH AVČR, která bez dalších úprav splňuje tyto požadavky. Požadavek na média v podobě běžného rozvodu elektřiny je v navrhované místnosti zajištěn.

3. GPC systém

1

5 040

Charakteristické vlastnosti:

Systém pro gelovou permeační chromatografii, obsahující HPLC sestavu s termostatovaným autosamplerem, UV-VIS detektorem s diodovým polem (DAD), refraktometrem a víceúhlovým detektorem rozptylu světla (MALLS).

Účel pořizovaného vybavení:

Stanovení distribuce molekulových hmotností polymerů. Toto stanovení je základní charakterizací při použití takových polymerů pro aplikace v živých systémech, protože biologické chování polymerů kriticky závisí na jejich molekulové hmotnosti. Proto bude toto zařízení klíčové jak pro aktivity VP2, tak pro aktivity VP1 využívající nanočásticové systémy v rostlinných buňkách a aktivity VP3, které testují připravené nanočástice v novém uspořádání EREM (obr. 5.2.1).

Připravenost infrastruktury:

Zařízení je možné instalovat do běžné chemické laboratoře, předpokládá se instalace v nedávno zrekonstruované místnosti č. 501 ÚMCH, která bez dalších úprav splňuje tyto požadavky. Požadavek na média v podobě běžného rozvodu elektřiny je v navrhované místnosti zajištěn.

4. CMOS kamera pro transmisní elektronový mikroskopii

1

4 266

Charakteristické vlastnosti:

16 MP CMOS kamera pro transmisní elektronový mikroskop FEI Tecnai G2 20 Sphera. Jedná se o vysoce citlivou kameru se scintilátorem, který má navíc obrovský dynamický rozsah, takže umožňuje jak efektivní nízkodávkové snímání kryo-preparátů, tak vysoce intenzivní přímé snímání difrakčních obrazců.

Účel pořizovaného vybavení:

Zásadním způsobem rozšíří zobrazovací možnosti mikroskopu Tecnai pro krystalografickou rekonstrukci tenkých proteinových krystalů a charakterizaci nanočástic. Proto bude využita zejména v rámci aktivit výzkumného cíle 3 tohoto VP, bude však sloužit i pro aktivity VP1 využívajících kombinací imunologických a nanočásticových přístupů pro elektronovou mikroskopii v rostlinných buňkách a aktivity VP3, které testují připravené nanočástice v novém uspořádání EREM (obr. 5.2.1).

Připravenost infrastruktury:

Kamera bude nainstalována do stávajícího mikroskopu, který je již umístěný v odpovídajících prostorech.

5. Funkční modul vybavení pro pokročilá zobrazování

1

2 603

Charakteristické vlastnosti:

Vybavení pro pokročilé mikroskopické fluorescenční a autoradiografické zobrazování zahrnující termostátovaný mikroskopický stolek (na bázi Peltierova článku, rozsah teplot -20 až + 100 °C, apertura 5 mm), pulsní laserové diody (s vlnovými délkami emitovaného záření 405 a 450 nm, laditelný výkon do 20mW, opakovací frekvence do 40 MHz, včetně kolimační optiky), software umožňující vyhodnocení dat z konfokálního mikroskopu pro techniky FLIM, FLIM-FRET a FLCS), instalaci nové základní optické lavice do stávajícího zařízení Typhoon obsahující kontinuální lasery 473, 532 a 635 nm a příslušné filtry pro vytváření digitálních 2D skenů pro vzorky obsahující fluorescenční značky. Součástí budou stolky pro upevnění různých typů vzorků včetně kultivačních misek. Dále soubor obsahuje fluorimetr pro měření excitačních a emisních spekter, rozsah excitace i emise nejméně 200-900 nm, s možností volby šířky štěrbin nejméně 0,5-20 nm pro charakterizaci fluorescenčních vlastností připravených fluorescenčních konjugátů pro zobrazovací techniky.

Účel pořizovaného vybavení:

Pokročilé zobrazování morfologie a funkčních vlastností během projektu připravených vzorků speciální mikroskopií a autoradiografií. Tento soubor je klíčový jak pro aktivity VP2, tak pro aktivity VP1, které využívají nanočásticové systémy v rostlinných buňkách a aktivity VP3, které testují připravené nanočástice v novém uspořádání EREM (obr. 5.2.1).

Připravenost infrastruktury:

Moderní konfokální mikroskop i autoradiografické zařízení Typhoon jsou ve VaV centru ÚMCH AVČR nainstalovány a jsou zajištěny všechny nezbytné podmínky pro jejich provoz, jako je umístění v čisté laboratoři s klimatizací, antivibrační optický stůl a další potřebné příslušenství. Zařízení je možné instalovat do laboratoře konfokální mikroskopie (místnost č. 816) respektive laboratoře v místnosti č. 501 (zobrazovací zařízení Typhoon), které bez dalších úprav splňují potřebné požadavky. Požadavek na média v podobě běžného rozvodu elektřiny je v navrhované místnosti zajištěn. Fluorimetr bude instalován v nedávno zrekonstruované místnosti č. 812 ÚMCH, která bez dalších úprav splňuje tyto požadavky.

6. GC systém

1

1 977

Charakteristické vlastnosti:

Plynový chromatograf s autosamplerem, tepelně vodivostním detektorem (TCD) a plamenově ionizačním detektorem (FID).

Účel pořizovaného vybavení:

Plynová chromatografie je nepostradatelnou metodou analýzy směsí pro sledování průběhu reakcí a čistoty chemických látek. Proto bude toto zařízení klíčové jak pro aktivity VP2, tak pro aktivity VP1, které využívají nanočásticové systémy v rostlinných buňkách a aktivity VP3, které testují připravené nanočástice v novém uspořádání EREM (obr. 5.2.1).

Připravenost infrastruktury:

Zařízení je možné instalovat do běžné chemické laboratoře, předpokládá se instalace v místnosti č. 508 ÚMCH, která bez dalších úprav splňuje tyto požadavky. Požadavek na média v podobě běžného rozvodu elektřiny a umístění lahví s technickými plyny (dusík, vodík, kyslík) je v místnosti 508 splněn.

7. Zařízení pro zamrazování tekutých vzorků

1

1 500

Charakteristické vlastnosti:

Zařízení pro automatizované zamrazování tekutých či extrémně tenkých vzorků. Technická specifikace je uvedena v příloze 10.

Účel pořizovaného vybavení:

Toto zařízení umožněním kontroly parametrů těsně před zmražením výrazně zvýší kvalitu a reprodukovatelnost výsledků dosahovaných strukturní kryoelektronovou mikroskopií. Zařízení je klíčové především pro aktivity VP2 výzkumného cíle 3. Je též nezbytné pro optimalizaci kombinací imunologických a nanočásticových přístupů pro elektronovou mikroskopii v rostlinných a živočišných buňkách (obr. 5.2.1).

Připravenost infrastruktury:

Zařízení je možné instalovat do běžné laboratoře. Požadavek na média v podobě běžného rozvodu elektřiny je v navrhované místnosti ZRIR IKEM zajištěn.

8. Bodotávek

1

1 425

Charakteristické vlastnosti:

Bodotávek pro více (nejméně 6) vzorků s automatickým odečtem, možnost optického sledování nejen teploty tání, ale i dalších teplotně závislých dějů v polymerech a jejich roztocích.

Účel pořizovaného vybavení:

Stanovení teploty tání jako základní charakteristiky nízko- i vysokomolekulárních látek, stanovení profilu teplotně závislých fázových změn v polymerech a jejich roztocích. Zařízení je klíčové především pro aktivity VP2.

Připravenost infrastruktury:

Zařízení je možné instalovat do běžné chemické laboratoře, předpokládá se instalace v nedávno zrekonstruované místnosti č. 808 ÚMCH, která bez dalších úprav splňuje tyto požadavky. Požadavek na média v podobě běžného rozvodu elektřiny je v navrhované místnosti zajištěn.

9. Funkční modul pro analýzu obrazu MR/CT

1

1 169

Charakteristické vlastnosti:

Funkční celek tvořený počítačem typu iMac disponujícím vynikajícím displejem v sestavě s vysoce výkonným procesorem a grafikou umožňující jednak použití softwaru Osirix určeného pro prohlížení a analýzu MR/CT obrazů a multilicencí software VGStudio Max 3.0 pro zpracování a analýzu medicínských obrazů a automatickou nebo poloautomatickou segmentaci a následnou tvorbu 3D animací.

Účel pořizovaného vybavení:

Zařízení je klíčové především pro aktivitu 6 výzkumného cíle 1 VP2 (obr. 5.2.1), tj. pro vývoj nových kontrastních látek pro MR.

Připravenost infrastruktury:

Zařízení je možné instalovat do běžné laboratoře. Požadavek na média v podobě běžného rozvodu elektřiny je v navrhované místnosti ZRIR IKEM zajištěn.

### 5.2.7. Vazba výzkumného programu na rozpočet projektu

Rozpočet pro tento výzkumný program je uveden v příloze 8 a komentář tohoto rozpočtu v příloze 9. Tvoří též součást povinných příloh vložených do aplikace do systému MS2014+.

### 5.3. Výzkumný program 3: Nové metody a zařízení pro vysokorozlišovací mikroskopii a chemickou analýzu nativních biologických vzorků

#### **Abstrakt**

Výzkum a vývoj špičkových analyticko-zobrazovacích zařízení a metod je klíčem k poznání fundamentálních jevů živé i neživé přírody. Výzkumný program staví na mnohaletých zkušenostech, znalostech a tradici VaV centra Environmentální elektronové mikroskopie Ústavu přístrojové techniky AVČR, které je průkopníkem techniky environmentální elektronové mikroskopie v ČR. Cílem výzkumného programu je ve spolupráci s partnery projektu realizovat výzkum a vývoj nových, vzájemně kombinovaných environmentálních elektronově mikroskopických, optických a chemických metod a zařízení, za účelem zvýšení kvality snímání a šetrnosti ke vzorkům výrazně za hranicí možnosti současných komerčních zařízení. Pomocí těchto technik budou novým způsobem zkoumány vysoce citlivé, nativní a vlhké vzorky z oblasti rostlinné i živočišné biologie, polymerní vzorky a led. V rámci tohoto výzkumného programu přinášíme koncepci nového low-dose vysokorozlišovacího environmentálního elektronového a optického fluorescenčního mikroskopu s citlivou X-Ray prvkovou a Ramanovou mikroanalýzou, spolu s možností mechanických i laserových mikromanipulací optimalizovaných pro živé nebo vlhké vzorky. Díky vzájemné integraci všech výše uvedených metod do jednoho zařízení a možnostem jejich paralelního použití bude projektem vytvořena nová dimenze korelativního zobrazování živých i neživých vzorků. Celé spektrum aplikovaných metod vhodně doplní vysokorozlišovací transmisní kryo-elektronová mikroskopie, a to zejména vzhledem k omezeným možnostem dosažitelného rozlišení optické, environmentální rastrovací a transmisní rastrovací elektronové mikroskopie vlhkých vzorků.

#### 5.3.1. Vazba na výzkumné programy centra, rozvoj centra

Výzkumný program přímo navazuje na dlouhodobě realizované aktivity VaV centra EEM ÚPT AV ČR, podrobně popsané v kapitole 3.4. Tématika programu reflektuje aktuální potřeby výzkumu a vývoje ve světě, cílené na in-vivo studium citlivých, často biologických a polymerních vzorků novými metodami, s nezbytnou podporou originální a excelentní instrumentace. Hlavním cílem programu je v účinné spolupráci s dalšími partnery podpořit klíčové aktivity projektu VaV centra ÚEB AVČR, hlavního navrhovatele projektu. Hlavní aktivity směřované k budoucímu rozvoji center, realizované v jednotlivých cílech programu, směřují do oblasti pokročilé mikroskopie ve vysokém rozlišení minimálně upravených, zcela nativních, případně speciálními nanočásticemi (SUPRAMOL ÚMCH AVČR) značených citlivých vzorků, zobrazovaných v nově koncipovaném analytickém EREM. Tento přístroj bude vybaven multidimenzionální korelativní mikroskopii, vycházející z kombinace optických zobrazovacích i manipulačních metod a elektron mikroskopických metod. Další charakterizace vzorků bude probíhat ve spolupráci s VaV centrem ZRIR IKEM, pomocí nukleární magnetické rezonance. Aktivity plánované pro jednotlivé cíle programu jsou značně ambiciózní, ale reálné, hlavně díky přímé návaznosti na stávající činnost VaV centra EEM ÚPT AV ČR a mnohaleté know-how v oblasti elektronové mikroskopie. Výzkumný program je rozdělen celkem na 4 výzkumné cíle, 1) Simulace interakcí elektronového svazku s plynem, kapalinou a pevnou látkou v EREM, 2) Nové, vysoce citlivé detektory a detekční principy pro EREM, 3) Nové metody pro charakterizaci vysoce citlivých vzorků, dynamické *in situ* experimenty a 4) Unikátní analytický EREM s vysokým rozlišením - integrace nových systémů a metod, korelativní mikroskopie.



#### ***Simulace interakcí elektronového svazku s plynem, kapalinou a pevnou látkou v EREM***

Výhodou environmentálního rastrovacího elektronového mikroskopu (EREM) [1,2] je možnost přímého pozorování elektricky nevodivých vzorků bez výskytu nábojových artefaktů [3,4], plně vlhkých vzorků [5,6,7], rostlin [8,9,10,11] nebo mikrogelových částic [12] a realizace „in-situ“ dynamických experimentů [13,14,15] v plynném prostředí jednotek až tisíců pascalů. Výraznou nevýhodou EREM je rozptyl svazku PE v plynu [16,17]. Dle Danilata [18,19] by rozlišení EREM mělo být srovnatelné s REM. Nicméně tzv. „skirt efekt“ způsobuje pokles proudu svazku ve stopě natolik, že odstup detekovaného signálu k šumu (SNR) je výrazně nižší. Tento zásadní problém je možno zmírnit zkrácením dráhy PE v plynu, zvýšením energie PE a proudu svazku, použitím nižší rastrovací rychlosti či volbou vhodného typu a tlaku plynu [20,21]. Zejména vysoký proud svazku (desítky až stovky pA) a nízká rychlost rastrování způsobuje velké radiační poškození citlivých biologických a polymerních vzorků a znemožňuje jejich studium v nativním stavu [22]. Vzhledem k představené problematice, je důležité studium rozptylových jevů, jak ukázali Berre et al. [23] a Mansour et al. [24]. Výsledky Monte Carlo (MC) simulací jsou využity pro optimalizaci techniky EREM s cílem zvýšení detekční účinnosti a potlačení „skirt efektu“ [25,26,27]. Vývoj detekčních systémů je doplněn MC simulacemi průchodu částic látkou [28]. Geant4 je často používaný program typu „open source“ poskytující infrastrukturu pro trasování částic skrz komplexní geometrie a detektory s možností doplnění fyzikálních procesů [29]. Program může být rozšířen o moduly pro simulaci interakce nabitých částic s vodou [30] a simulaci raného biologické poškození indukované ionizujícím zářením v DNA měřítku [31], které může být využito pro studium radiačního poškození v EREM.

Navrhovaný projekt bude tuto problematiku detailně řešit v rámci cíle 1. Z hlediska náročnosti, značně ambiciózním výsledkem bude komplexní software pro simulaci interakcí primárního elektronového svazku s plynem, kapalinou i pevnou látkou. Výsledky výzkumu a vývoje realizované aktivitami tohoto cíle jsou z celosvětového hlediska zcela unikátní. Mají zásadní význam v oblasti základního výzkumu (komplexní simulace fyzikálních jevů provázejících interakce elektronů s látkou různého skupenství) i vysoký potenciál pro další aplikovaný výzkum. Výsledky MC simulací rozptylu svazku v plynném prostředí EREM umožní optimalizovat elektronově optickou soustavu tubusu EREM, navrhnout nový design diferencially čerpaných komor včetně detektorů.

#### ***Nové, vysoce citlivé detektory a detekční principy pro EREM***

Pro možnost studovat citlivé vzorky s nízkou emisivitou signálních elektronů v EREM je zcela zásadní výzkum a vývoj nových, vysoce citlivých detekčních systémů. Nejúčinnější detektor sekundárních elektronů (SE) v EREM pracuje na principu ionizace plynu. K zesílení signálů dochází prostřednictvím ionizační kaskády vznikající mezi uzemněným držákem vzorku a signální elektrodou umístěnou pod pólovým nástavcem objektivové čočky, na níž je přivedeno kladné napětí [32,33,34]. Úroveň zesílení signálu SE je závislá především na intenzitě elektrostatického pole mezi zemí a detekční elektrodou, tak jako na tlaku a typu plynu [35,36,37]. První komerčně používaný EREM detektor nazývaný environmental secondary detector (ESD) [38] byl tvořený jednou elektrodou. Později byl vylepšen v tzv. gaseous secondary electron detector (GSED), který je patentován firmou FEI. GSED je schopen detekovat signál s vyšším podílem SE, nikoliv však bez příspěvku parazitního signálu [39,40,41]. Simulace jednotlivých příspěvků SE, PE a zpětně odražených elektronů (BSE) na celkové ionizační zesílení signálu prezentovala Meredith et al. [42]. Křivky ukazující malý

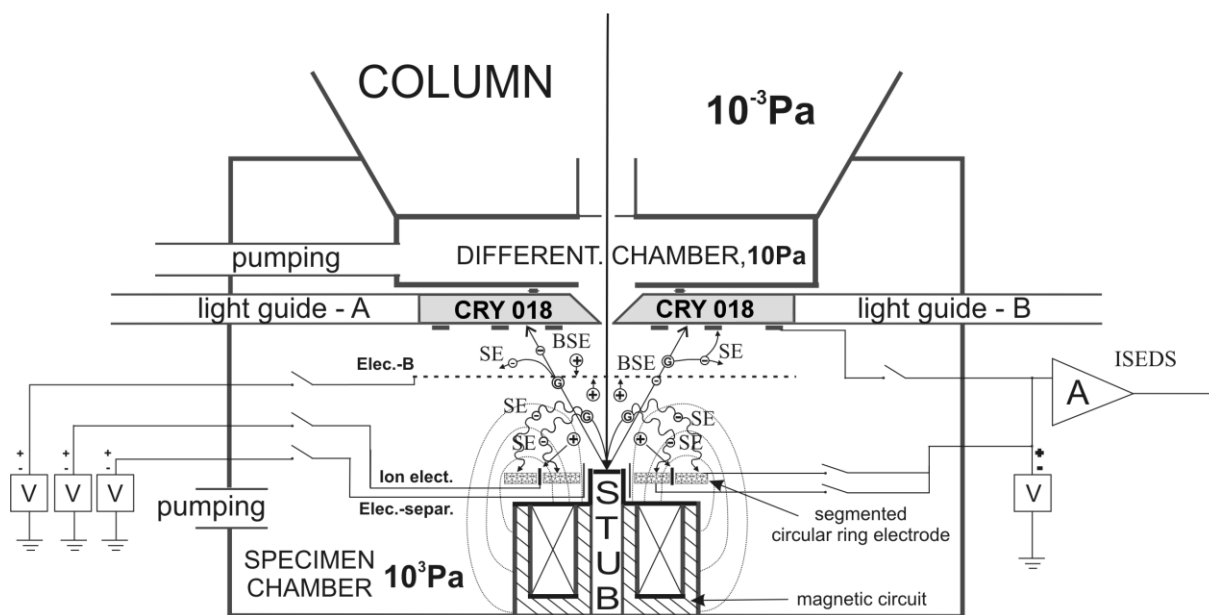
příspěvek BSE k signálu zesílenému nárazovou ionizací v plynu a detekovanému GSED publikoval Fletcher [37]. Nejnovějším detekčním systémem, reprezentujícím poslední výsledky výzkumu v oblasti detekce SE v EREM je detektor Helix, patentovaný firmou FEI. Systém využívá magnetické pole vysokorozlišovací magnetické imerzní objektivové čočky a elektrostatické pole kruhové detekční elektrody umístěné ve spodní části objektivu [43,44].

Některé z metod detekce signálních elektronů byly vyvinuty i naším týmem EEM. Aufrata et al. [45] navrhl velmi citlivý BSE detektor pro zobrazení materiálového kontrastu, využívající originální scintilační monokrystaly YAG (yttrium aluminium garnet) a YAP (yttrium aluminium perovskite). Tento scintilačně-fotonásobičový detektor je běžně používán v REM, ale také v mikroskopech typu VP-REM od firmy Hitachi. Scintilátor YAG s malou dírou ve svém středu souběžně používaný jako druhá tlak omezující clona (PLA) našeho mikroskopu EREM AQUASEM byl použit pro studium vlhkých biologických vzorků [46,47]. YAG BSE detektor byl následně přizpůsoben pro detekci SE a zobrazení topografického kontrastu do podoby tzv. kombinovaného detektoru [48,49,50]. Experimentální výsledky ukázaly, že použitím kombinovaného detektoru v EREM je možno ve vysokém tlaku plynu zobrazit čistý materiálový kontrast. Pro možnost zobrazení topografického kontrastu je kombinovaný detektor vybaven tenkou elektrodou deponovanou na spodní straně krystalu YAG. V případě přiložení kladného napětí [51] pracuje tento detektor obdobně jako ESD.

Tým EEM také studoval problematiku nalezení vhodné metody pro potlačení BSE pozadí v signálu ionizačního detektoru [52]. Obdobně jako v práci Danilata [38] byl ionizační detektor realizován kruhovou detekční elektrodou.

Naše nedávná práce z oblasti vývoje detekčních systémů pro EREM je reprezentována patentovaným ionizačním detektorem sekundárních elektronů s elektrostatickým separátorem (ISEDS) [53,54]. Tento systém umožňuje detekovat silně zesílený signál SE minimálně zatížený BSE a jako první na světě umožňuje v tlaku od 50 Pa do 300 Pa detekci energiově separovaných signálních elektronů [55]. Vývoj byl podpořen grantovým projektem GAAV KJB 200650602, vedeným žadatelem projektu. V současnosti je detektor optimalizován aplikací magnetického pole pro zvýšení signálového zesílení.

V současné době probíhá integrace detektoru ISEDS, v kombinovaný detekční systém pro SE a BSE v EREM, viz obrázek 5.3.1. BSE zde budou detekovány novou generací vysoce účinného scintilačního monokrystalu. Tato práce byla podpořena projektem Grantové agentury České Republiky (GAP 102/10/1410), jehož řešitelem byl vedoucí výzkumného programu 3 (VP 3). Posledním z našich nových detektorů, který bude patentován v nejbližší budoucnosti je scintilační detektor SE pro REM a EREM [56,57].



**Obrázek 5.3.1: Kombinovaný detekční systém pro SE a BSE v EREM.**

Aby bylo možné pochopit generaci signálů v plynném prostředí, byl program EOD [58] rozšířen o MC modul zahrnující simulace rozptylových procesů elektronů s plynem v komoře vzorku EREM [59, 60].

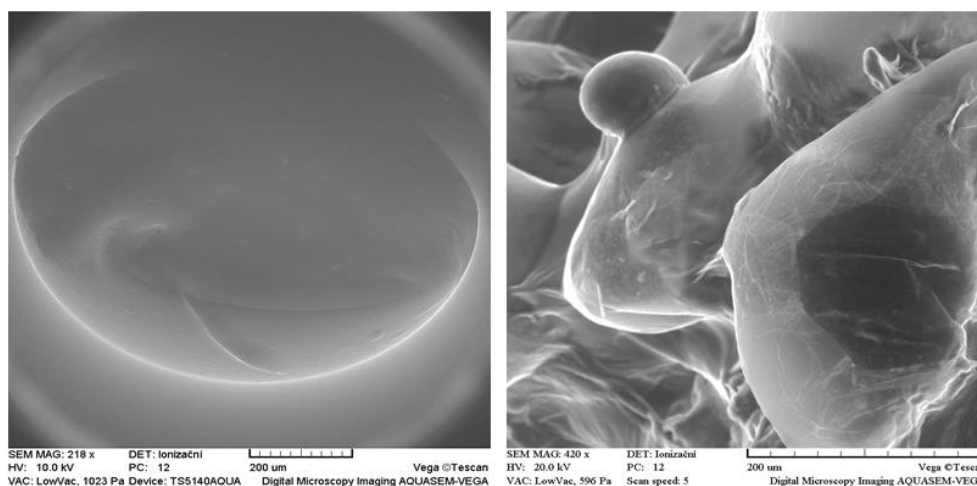
Náš scintilační detektor SE pro REM a EREM je jako jeden z mála na světě schopný kontinuální a bezproblémové práce v tlacích od 0,001 Pa do 1000 Pa a zobrazení velmi citlivých vlhkých vzorků při použití proudu svazku PE 1 pA. Také detektory specializované pro zobrazování vzorků při dynamických in-situ experimentech zcela chybí. Námi patentovaný ISEDS je v současné době jediný detektor schopný energiové filtrace a současně ultra-vysokého zesílení detekovaného signálu v EREM. VaV centrum EEM je jako jediné v ČR vybaveno novým Wet-STEM detektorem firmy FEI pro studium nanočástic v kapalinách. Wet-STEM detektor je vysoce specializované zařízení, jehož použití je spíše ojedinělé. Tento detektor představil v roce 2005 Borger et al. [61]. Jeho použití v EREM pro studium magnetických nano-vektorů publikoval Maraloiu et al. [62]. Dokonalejší alternativy, funkční vylepšení nebo zcela nové koncepce detekce nano-objektů v kapalinách pro EREM nejsou doposud známy a proto jsou také předmětem řešení projektu v rámci cíle 2.

Detektory jsou jednou z nejdůležitějších součástí EREM. Na jejich kvalitě a technických parametrech záleží rozlišení v obraze i spektrum detekovatelných informací. VaV centrum EEM je v oblasti výzkumu a vývoje detektorů pro EREM světovou jedničkou. Je jedním z mála pracovišť, které je vybaveno vlastním MC softwarem schopným s relativně velkou přesností simulovat interakce signálních elektronů s plynem. Ambicióznost a celkový přínos pro základní i aplikovaný výzkum je založena na řadě nových detektorů, které budou v průběhu řešení projektu vyvinuty a použity pro výzkum v oblasti biologie a chemie.

### ***Nové metody pro charakterizaci vysoce citlivých vzorků, dynamické in-situ experimenty***

Základní metody pro nastavení vhodných termo-dynamických podmínek v komoře vzorku EREM [63,64] jsou pro pozorování velmi citlivých vlhkých vzorků v EREM nedostatečné. Doposud není možné uspokojivě měřit teplotu ani tlak plynu v blízkém okolí či na povrchu vzorku. Integrací mikro senzorů teploty a tlaku do držáku vzorku se doposud zabýval pouze Lary et al. [65]. Simulacemi proudění plynů v komoře vzorku EREM se dle informací skupiny

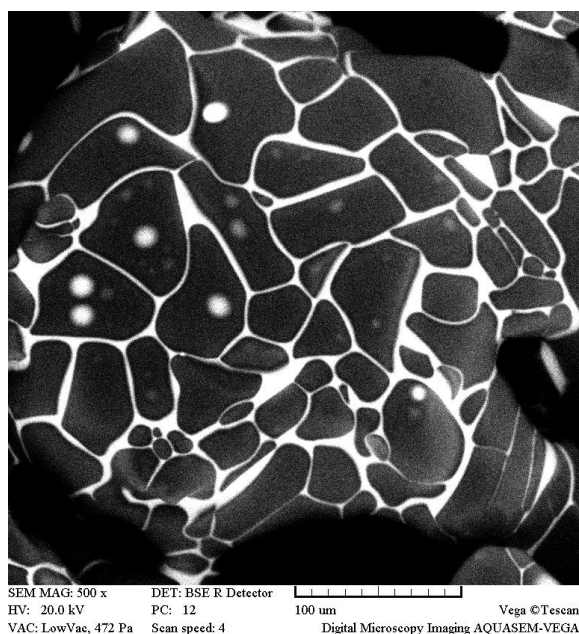
EEM v současné době zabývají pouze dvě skupiny na světě. Danilatos et al. [66] představil návrhy konstrukčních modifikací diferenciálně čerpané komory EREM a z hlediska účinnosti čerpání tohoto prostoru a rozptylu primárního svazku v něm srovnal komerční zařízení firem FEI a Zeiss [67]. Výsledky simulací Danilata [66] ověřila pomocí odlišné výpočetní metody a softwaru ANSYS skupina VaV centra EEM [68]. Dále byly skupinou EEM publikovány výsledky simulací proudění plynů v diferenciálně čerpané komoře EREM AQUASEM II [69] a speciálním detektoru pro EREM [70]. VaV centrum EEM představilo novou metodu pro dlouhodobé pozorování biologických vzorků [71] a novou metodu pro dynamické in-situ experimenty, jako jsou studium sušení biologických vzorků [72], pozorování dynamiky tvorby vodních kapek a krystalizace soli v EREM [73]. V posledních pracích VaV centra EEM je představena nová metoda pro studium přirozených struktur somatických embryí a "extracelulární matrix" [74,75], viz obr. 5.3.2. Nízko teplotní rastrovací elektronová mikroskopie (LTREM) [76] byla úspěšně použita pro studium povrchu sněhu přirozeného [77] i laboratorně vytvořeného, na rozhraní jeho zrn [78] stejně tak jako nečistot na hranicích zrna nebo prachových částic na povrchu zrn [79]. Bohužel LTREM vyžaduje podmínky nízkého tlaku plynu v komoře vzorku (obvykle pod  $10^{-4}$  Pa) což způsobuje problémy s potenciální nežádoucí sublimací ledu, nazývanou (teplotní) leptání odhalující nečistoty, které by jinak zůstaly pohřbeny pod povrchem ledu. Bylo provedeno jen velmi málo studií popisujících nekontaminovaný led při vysokém tlaku EREM [80]. VaV centrum EEM se specializuje na vývoj a testování nových metod pro studium morfologie přirozeného či kontaminovaného ledu (Obr. 5.3.3) a dynamických in-situ experimentů s ledy za použití našeho nekomerčního mikroskopu EREM AQUASEM II [81,82]. Nové metody studia velmi citlivých biopolymerů jako jsou sférických PEC (polyelectrolyte complex beads) obsahujících živé buňky nebo bez buněk, byly nedávno vyvinuty VaV centrem EEM. V současné době jsme jediní na světě schopní studovat tento typ vzorky v jejich nativním a plně vlhkém stavu [83,84,85].



**Obrázek 5.3.2: EREM snímky nativních vzorků.** Nalevo, půlené nativní a zcela vlhké polyelektrolytové kapsle obsahující živé buňky v polotekutém jádře pomocí EREM. Napravo, "extracelulární matrix" na povrchu ranného somatického embrya v nativním stavu zobrazeného pomocí Low Temperature metody pro EREM.

Schopnost přesně nastavit a kontrolovat termodynamické podmínky v oblasti stopy svazku a jejího okolí na povrchu vzorku v EREM je klíčové pro většinu aplikací EREM a přitom vzhledem

ke komplexnosti a složitosti problému stále nemožné. Dosáhnout tohoto stavu i v případě, kdy jsou zkoumány velice citlivé vzorky je proto z celosvětového hlediska značně ambiciózní. VaV centrum EEM patří v současné době ke světové špičce v oblasti nových metod pro EREM, zejména metod pro studium ledu v environmentálních podmínkách a morfologické charakterizace zcela nativních a vlhkých polyelektrolytových kapslí (Obr. 5.3.2). Problematika řešená v rámci cíle 3 tohoto výzkumného programu je nezbytná pro výzkum a vývoj unikátních metod pro studium biologických a polymerních vzorků a logicky zapadá do kontextu projektu. Z hlediska základního výzkumu budou zkoumány nové kontrasty na nativních površích biologických vzorků, což může přinést průlomové možnosti v aplikacích EREM do biologických věd. Vysoký potenciál pro aplikovaný výzkum je podložen prokazatelným zájmem firem vyrábějících elektronové mikroskopy a jejich jednotlivé komponenty.



**Obrázek 5.3.3: Kontaminace ledu roztokem uranlyu o vysoké koncentraci.** Kontaminace bylo dosaženo odpařením vody v rámci dynamického in-situ experimentu v EREM.

### ***Unikátní analytický EREM s vysokým rozlišením - integrace nových systémů a metod, korelativní mikroskopie***

Je známo několik realizovaných integrací pokročilých technologií a metod do REM a EREM. Jensen et al. [86] publikoval výsledky in-situ studia elektrochemických procesů v REM pomocí cyklické voltametrie integrované do utěsněné elektrochemické cely. Integraci komerčně dostupného Ramanova spektrometru do EREM vybaveného EDS, detektorem katodoluminiscence a STEM detektorem publikoval Guillaume et al. [87]. Nesporné přínosy kombinace optického mikroskopu s REM při použití speciálních postupů barvení biologických vzorků syntetickými látkami publikoval Perkovic et al [88] a při studiu neurologických buněk a tkání Shannon et al [89].

Problematika výzkumu, vývoje a integrací nových technologií do elektronových mikroskopů a samotný vývoj elektronových mikroskopů je velice složitá, nákladná a z hlediska možného poškození mikroskopů riziková činnost. Současně však je zcela zásadní pro celosvětový výzkum a vývoj v mnoha vědních oborech. Na světě je jen několik málo vědeckých skupin, které by měly know-how a vědecko-technické zázemí na takové úrovni, aby byly schopny tyto aktivity úspěšně realizovat. Námi navrhované technické řešení integrace EREM s Ramanovým

spektrometrem a optickým mikroskopem je světově unikátní. V kombinaci s dalšími systémy, jako jsou systémy optické a mechanické mikromanipulace, cílené injekce plynů a kapalin s novým hydratačním systémem pro EREM a dalšími systémy tak vznikne pracoviště světové vědecké excelence zaměřené na studium citlivých, nativních a živých vzorků v EREM a realizaci speciálních dynamických in-situ experimentů. Vysoká ambicióznost je v případě řešení tématiky v rámci výzkumného cíle 4 nesporná a význam pro základní i aplikovaný výzkum také.

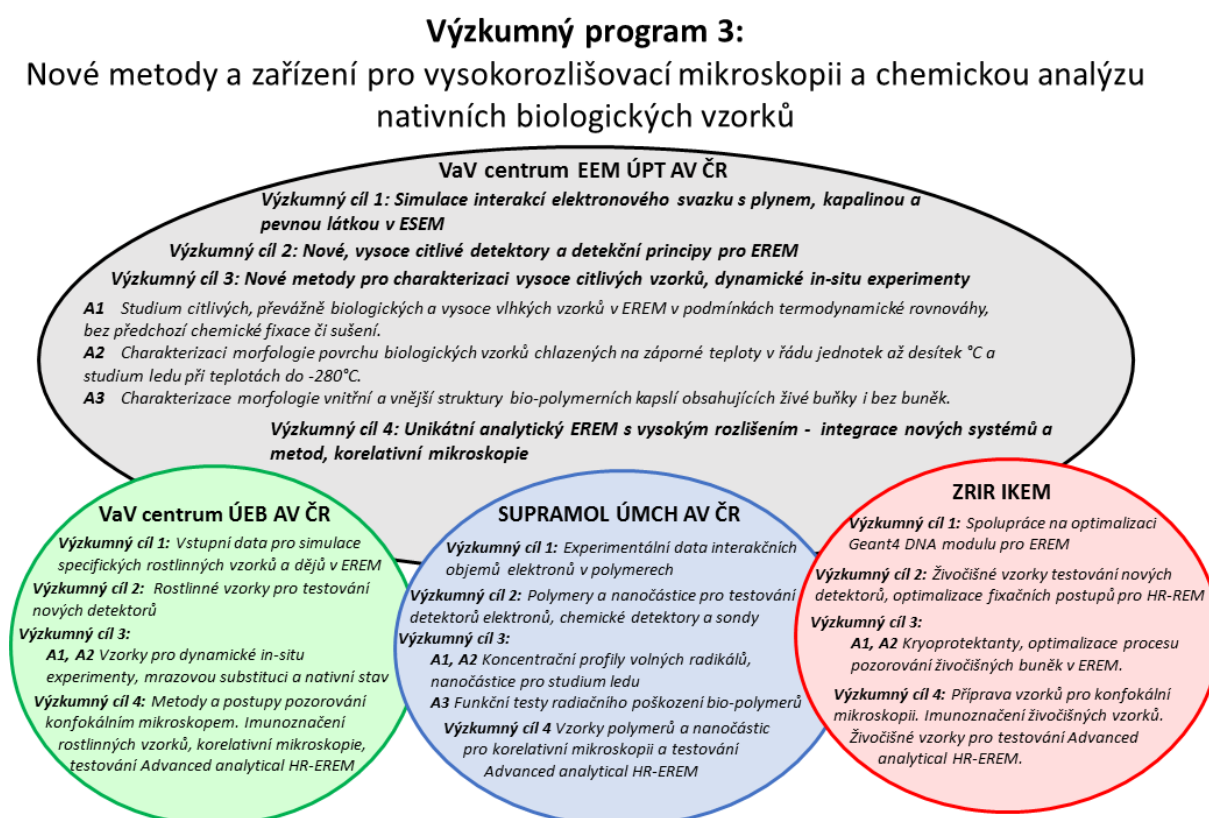
### Citace zmíněné v kapitole 5.3.2:

- [1] Danilatos, G.D., *Foundation of ESEM*, Sydney, Academic Press, (1988), p. 249
- [2] Danilatos, G.D., *Scanning* 4 (1981) 9-20
- [3] Danilatos G.D., *Materials Research*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1997) 14-44.
- [4] Danilatos, G.D., *J. Microsc.* 162 (1991) 391-402
- [5] Cameron R.E. et al., *J. Microsc.* 173 [3] (1994) 227-237
- [6] Royall C.P. et al., *Scanning* 24 (2002) 305-313
- [7] Stelmashenko N.A. et al., *J. Microsc.* 204 (2001) 1-13
- [8] Danilatos, G.D., *J. Microsc.* 121 (1981) 235-238
- [9] Stabenheiner E. et al., *Protoplasma* 249 (2010) 89-99
- [10] Popielarska-Konieczna M. et al., *Protoplasma* 247 (2010) 121–125
- [11] Mc Gregor J.E. et al., *J Microsc* 239 (2) (2009)135-141.
- [12] Garcia-Salinas M.J. et al., *J. Colloid and Interface Science* 342 (2010) 629-635
- [13] Kjelsen, K.O. et al., *Adv. Cem. Based Mater.* 3 (1996) 14-19
- [14] Danilatos, G.D. et al., *Scanning Electron Microsc.* 1 (1982) 1-16
- [15] Huggett, J.M. et al., *Sci. Eng.* 23 (1994) 255-266
- [16] Wight, Scott, A., *Scanning* 23 (2001) 320-327
- [17] Wight, Scott, A. et al., *Scanning* 22 (1999) 167-172
- [18] Danilatos, G.D., *J. Microsc.* 160 (1990) 9-19
- [19] Danilatos, G.D., *Micron and Microscopica Acta* 14 (1983) 307-319
- [20] Gauvin, R., *Surf. Interface Anal.* 37 (2005) 875-886
- [21] Berre, J.F.Le. et al., *Scanning* 29 (2007) 114-122
- [22] Arnoult, C. et al., *Ultramicroscopy* 122 (2012) 32-36
- [23] Le Berre, J.F. et al., *Scanning* 29, (2007) 114-122.
- [24] Mansour, O. et al., *Vacuum* 87, (2013) 11-15.
- [25] Belkorissat, R. et al., *Microne* 25, (2004) 543-547
- [26] Zoukel, A. et al., *Microne* 44, (2013), 107-114
- [27] Fitzek, H. et al., *J. Microscopy* 262-1 (2016), 85-91
- [28] Kieft, E. et al. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 41 (2008), 10pp
- [29] Agostinelli, S. et al., *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res:A* 506(3) (2003), 250-303
- [30] Bernal, M.A. et al., *Phys. Medica* 31 (2015) 861-874
- [31] Champion, C. et al., *Rad. Phys. Chem.* 78 (2009) 745-750
- [32] Danilatos, G.D., *Proc. 50th Annual Meeting EMSA* (1992) 1302-1303
- [33] Danilatos, G.D., *Mikrochimica Acta* 114/115 (1994) 143-155
- [34] Danilatos, G.D., *Microsc. Microanal.* 6 (2000) 12-20
- [35] Meredith, P. P. et al., *Scanning* 18 (1996) 467-473.
- [36] Thiel, B. L. et al., *J. Microsc.* 187 (1997) 143-157
- [37] Fletcher A.L. et al., *J. Phys. D:Appl. Phys.* 30 (1997) 2249-2257
- [38] US Patent Number: 4,897,545 (gaseous detector device, by Danilatos)
- [39] Fletcher A.L. et al., *J. Microsc.* 196 (1999) 26-34
- [40] European Patent Number: 99200725,2
- [41] US Patent Number 5362964.
- [42] Meredith P. et al., *Scanning* 18 (1996) 467-473
- [43] Thiel, B.L. et al., *Review of Scientific Instruments* 77 (2006) 033705

- [44] Rice, T. et al., *Microscopy Today*, May, (2005) 40-42
- [45] Autrata R. et al., *Scanning* 14 (1992) 127-135
- [46] Ushiki T. et al., *J. Electron Microsc.* 47 (4) (1998) 351-354
- [47] Hashizume H. et al.: *Arch. Histol. Cytol.* 61 (2) (1998) 93-98
- [48] Autrata R. et al., *Journal of Computer-Assisted Microscopy* 9 (2) (1997) 115-116
- [49] Romanovský V. et al., *Fine mechanics and optics* 45 (10) (2000) 273-274
- [50] Romanovský V. et al., *European Microscopy and Analysis* 59 (1999) 19-20
- [51] Autrata R. et al., *Microsc. Microanal.* 9 (Sup. 3) (2003) 142-143
- [52] Schneider L. et al., *Proc. 6th Multinational Congress on Microscopy*, Pula (2003) 495-496
- [53] Neděla V. et al., *16th International Microscopy Congress, 2006, Japan, Vol.2 s. 982*
- [54] European Patent Number: 2195822
- [55] Neděla V. et al., *Proc. 17th Internat. Microsc. Congress, Rio de Janeiro I10.9, (2010) 1-2.*
- [56] Jiráček, J. et al., *J. of Microsc.* Vol. 239 (3), (2010) 233-238.
- [57] Jiráček, J. et al., *Microsc. Microanal.* 17 (Sup.2), (2011) 922-923.
- [58] Lencová B., *Microsc. Microanal.* 13 (Suppl 3), (2007) 2.
- [59] Neděla, V. et al., *Microsc. Microanal.* 17 (Sup.2), (2011) 920-921.
- [60] Neděla, V. et al., *Nucl. Instrum. Methods in Physics A*, Vol. 645, (1), (2011) 79-83
- [61] Borger, A. et al., *Ultramicroscopy* 104 (2005) 290-301.
- [62] Maraloiu et al., *J. Colloid and Interface Science* 352 (2010) 386-392.
- [63] Cameron, R.E. et al., *Journal of Microscopy*, 1994, vol. 173, p. 227 – 237.
- [64] Royall, C.P. et al., *Scanning*, 2002, vol. 24, p. 305-313, ISSN 0161-0457.
- [65] Leary, R. et al., *J. of Physics: Conference series* 241 (2010) 012024.
- [66] Danilatos G.D., *Microne* 43 (2012) p.600-611.
- [67] Danilatos G.D. et al., *J. Microscopy* 242 (2011) 166-180.
- [68] Maxa, J. et al., *Advances in Military Technology*. 2016. In print
- [69] Maxa, J. et al., *Advances in Military Technology*. 2011. 6(1). p. 39 - 47.
- [70] Maxa, J. et al., *Miroscopy and Microanal.* 2012(18) p. 1264 - 1265.
- [71] Neděla, V., *Mic. Res. Tech.*, 70 (2), (2007) 95-100.
- [72] Neděla, V., *J. Microsc.*, 237 (1), (2010) 7-11.
- [73] Runštuk, J. et al., *Proc. MC 2009, Graz, Vol.1 (2009) 225-226.*
- [74] Neděla, V. et al., *Biologia plantarum* 56 (3), (2012), 595-598.
- [75] Neděla, V. et al., *Microne* 84 (2016) 67-71.
- [76] Blackford, J.R., *J. Phys. D Appl. Phys.* 2007, 40, R355-R385.
- [77] Barnes, P.R.F. et al., *Microsc. Res. Techniq.* 2003, 62, 62-69.
- [78] Barnes, P.R.F. et al., *J. Microsc.-Oxford* 2002, 205, 118-124.
- [79] Barnes, P.R.F. et al., *Microsc. Res. Techniq.* 2003, 62, 62-69.
- [80] Waller, D.; Stokes, D.J.; Donald, A.M., *Rev. Sci. Instrum.* 2008, 79.
- [81] Neděla, V. et al., *Microscopy and Microanalysis*. 2015, 21, s. 1699-1700.
- [82] Krausko, J. et al., *Langmuir*. 2014, roč. 30, č. 19, s. 5441-5447.
- [83] Bertóková, A. et al., *Biocatal. and Biotransform.* 2015, Roč. 33, č. 2, s. 111-120.
- [84] Neděla, V. et al., *Microscopy and Microanalysis*, 21, 2015, s. 1697-1698.
- [85] Schenk Mayerová, A. et al., *App. Biochem. and Biotechnol.* 2014, roč. 174, č. 5, s. 1834-1849.
- [86] Jensen et al., *Ultramicroscopy* 129 (2013) 63-69.
- [87] Guillaume W., *Microne* 67 (2014) 50-64.
- [88] Perkovic et al., *Journal of Structural Biology* 186 (2014) 205-213.
- [89] Shannon M. et al., *Microne* 42 (2011) 773-792.

### 5.3.3. Výzkumné cíle, aktivity a výsledky

Výzkumný program 3 je zaměřen na výzkum a vývoj klasického EREM s vysokým rozlišením v novou generaci komplexního analytického mikroskopického přístroje, schopného poskytnout nové informace o širokém spektru obtížně pozorovatelných, převážně nativních a vlhkých biologických a polymerních vzorcích. To vše v korelaci s řadou nových, speciálních i klasických metod. Těžištěm vývoje bude studium interakce elektronů s látkou (Cíl 1), nezbytné pro vývoj nových detektorů a detekčních principů (Cíl 2), metod a postupů pro charakterizaci citlivých vzorků či dynamických in-situ experimentů (Cíl 3) vyúsťující v konstrukci EREM nové generace (Cíl 4). Ve výzkumných aktivitách těchto cílů se řešení účastní jak navrhovatelské pracoviště ÚEB AV ČR, tak dvě partnerské pracoviště SUPRAMOL ÚMCH AV ČR a ZRIR IKEM (Obr. 5.3.4).



**Obrázek 5.3.4: Schematické zobrazení výzkumného programu 3.** Těžištěm tohoto výzkumného programu je partnerské VaV pracoviště EEM ÚPT AV ČR (šedivá). Zapojení navrhovatelského pracoviště ÚEB AV ČR (zelená) a partnerských VaV pracovišť SUPRAMOL ÚMCH AV ČR (modrá) a ZRIR IKEM (červená) je specifikováno pro jednotlivé výzkumné aktivity EEM ÚPT AV ČR.

**Výzkumný cíl 1: Simulace interakcí elektronového svazku s plynem, kapalinou a pevnou látkou v EREM.**

**Vedoucí výzkumného cíle:** Mgr. Martin Oral, Ph.D.

V závislosti na typu vzorku a podmínkách, v nichž je pozorován, mohou primární elektrony (PE) v EREM procházet a interagovat s látkami v různých formách jejich skupenství, např. s plynem (prostředí v diferencially čerpaných komorách a komoře vzorku), vodným roztokem či kapalinou (vrstva na povrchu vzorku či vzorek v kapalném stavu) a pevnou látkou (vzorek).



Průchodem PE plynným prostředím dochází k rozostření stopy svazku PE a vzniku takzvané sukénky „skirt“, vymezející oblast kolem původní, nerozostřené stopy svazku, do které dopadají elektrony pod různým úhlem a s nižší energií. Vrstva vody na povrchu vzorku následně způsobuje další rozostření svazku PE a má negativní vliv na detekci signálních elektronů emitovaných ze vzorku. Rozptyl svazku PE v tomto vícevrstevném systému v konečném důsledku způsobuje nižší dosažitelné rozlišení, což je hlavní nevýhodu EREM v porovnání s REM. Neméně závažné problémy nastávají v případě rentgenové mikroanalýzy v EREM, kdy je výrazně potlačeno prostorové rozlišení projevující se chybnou detekcí intenzit případně detekcí fantomových materiálů.

Interakce elektronů s látkou je možno matematicky simulovat na základě Monte Carlo (MC) modelů. Simulace těchto dějů je nutno realizovat s ohledem na prostředí, včetně přechodových rozhraní mezi nimi. Ve světě doposud neexistuje software, který by byl schopen simulovat rozptyl elektronů ve vícevrstevném prostředí představujícím reálný vzorek v EREM zobrazovaný rastrovacím případně v transmisním módu.

***Tato aktivita se skládá z následujících oblastí:***

**Vytvoření komplexního programového kódu pro MC simulace PE šířících se ve vysokotlakém prostředí EREM až po fokusaci primárního svazku na vzorek a následnou interakci se vzorkem, případně po průchodu vzorkem znovu s plynem.**

Základem simulačního kódu MC je přesný integrátor trajektorií elektronů v elektrických a magnetických polích optických prvků a detektorů. Jedná se o deterministickou část výpočtu. Pro desítky keV už se začíná významněji projevovat relativistická dynamika pohybu, ale pro nízké energie je její vliv zanedbatelný (a je lépe použít nerelativistickou formulaci).

Oproti známým algoritmům bude věnována větší pozornost použití správných rozdělení hustot pravděpodobnosti. Počáteční rešerš bylo zjištěno, že neznalost těchto funkcí často vede autory k jejich nahrazení tím, že daná deterministická část trajektorie se rozdělí na uměle vysoký počet kroků, a v každém z nich se znovu vyhodnocuje pravděpodobnost srážky pomocí náhodných čísel s rovnoměrným rozdělením (jen případně vhodně parametrizovaného). Při použití správného postupu generování náhodných dat to sice statisticky vede na ekvivalentní výsledky (příslušné funkce hustot jsou v něm totiž stanoveny implicitně), na druhé straně je tento způsob výpočtu pomalý a mohou se při něm kumulovat zaokrouhlovací chyby. Bylo zjištěno, že řada náhodných procesů při srážkách může být popsána hustotou pravděpodobnosti buď zadanou analytickou funkcí, nebo může být vypočtena předem pomocnou MC simulací. Je očekáváno významné zrychlení výpočtu.

Interakce elektronů s pevnou látkou bude řešena použitím hotového specializovaného programu nebo knihovny, přičemž programy do sebe budou výsledně integrovány. Dle výsledků dlouhodobého testování dostupných softwarů bude s vysokou pravděpodobností k tomuto účelu použit program Geant4 včetně jeho specializovaných knihoven a modulů. Jde totiž o velmi komplikovanou část výpočtů a její elementární řešení by bylo nad možnosti projektu. Podobně i data o proudění pracovního plynu v komoře a rozdělení tlaku budou simulována ve specializovaném softwaru a do zde popisovaného programu budou naimportována. Použití externího kódu pro interakci elektronů v látce a pro výpočet proudění plynu si však nevynucují zjednodušení celkového fyzikálního modelu simulace. Program bude vytvářen postupně od fyzikální popisu nerozptýleného svazku PE procházejícího tubusem mikroskopu a až po interakce PE:

- a. s plynem, a to s prostorově závislým rozložením koncentrace molekul (tlaku), které je dáno dynamikou proudění pracovního plynu při jeho odčerpávání skrze tlak omezující clony, v podzvukovém i nadzvukovém režimu.
- b. s vodou či vodným roztokem, pokrývající biologické vzorky případně kondenzující na jejich povrchu, nebo vzorkem v kapalném stavu.
- c. s pevnou látkou samotného vzorku, včetně generace signálních elektronů.

### **Rozšíření základního kódu o moduly zaměřené na konkrétní problémy EREM a partnerů projektu.**

Ve spolupráci s partnerskými VaV centry IKEM a ÚEB AV ČR budou vytvořeny modely pro simulace specifických rostlinných a živočišných vzorků a dějů, které je možno studovat v EREM. S partnerské pracoviště SUPRAMOL ÚMCH AV ČR bude spolupracováno na aplikaci a testování „Geant4-DNA chemistry module“ pro studium radiačního poškození biologických vzorků v podmínkách EREM a studium chemických procesů v polymerních systémech.

Pro možnost studia degradačních mechanismů v EREM bude základní kód rozšířen o modul pro simulaci akumulace tepla a elektrického náboje ve vzorku v důsledku interakce PE. Studium nových kontrastů v detekci signálních elektronů umožní modul zohledňující vliv struktury pevných látek, např. pro studium rozptylu svazku PE v ledu. setekce signálních elektronů.

#### **Milníky:**

Uvedené výsledky představují klíčová vstupní data následujících cílů 2 a 3 a budou průběžně publikovány v minimálně 4 odborných publikacích (typ výsledku 2 02 11):

**1)** Komplexní kód schopný simulovat transport PE jednotlivými částmi mikroskopu od místa emise PE v tubusu mikroskopu až po místo jeho zániku ve sledovaném vzorku a jeho případnou transformaci v signální elektron. *Výstup poskytne detailní popis chování částice v mikroskopu potřebný pro následný vývoj detektorů a pozorovacích metod.*

**2)** Optimalizace MC software pro simulaci rozptylu PE svazku v tlakovém spádu včetně integrace dat ze simulací rychlosti prodění molekul plynu v systému diferenciálně čerpaných komor a komory vzorku EREM. *Výstup poskytne doposud nepřesnější výsledky simulací interakcí elektronů v reálném prostředí EREM, v současnosti je velikost tlaku plynu i rychlost jeho molekul v simulacích uvažována jako konstantní.*

**3)** Simulace emise signálních elektronů v EREM, jako základ pro výzkum a vývoj nových detekčních systémů pro EREM. *Výstup v logické návaznosti vytvoří vstupní data pro aktivity spojené s výzkumem a vývojem nových detekčních systémů pro EREM.*

**4)** Další nadstavby MC softwaru pro studium dlouhodobého vlivu svazku PE na vzorek z hlediska ohřevu vzorku, příp. nabíjení. *Výstup umožní výzkum a vývoj metod pro speciální experimenty s cílem maximálně šetrného zkoumání citlivých povrchů s přesahem do oblasti korelativní mikroskopie.*

**5)** Popis elektrochemických procesů ve vodě po dopadu elektronového svazku. Studium radiačního poškození vzorku, identifikace hlavních mechanismů vzniku volných OH radikálů, jejich koncentračních profilů a následného šíření volných radikálů studovaným systémem. *Výstup umožní popsat míru a intenzitu poškození vzorků elektrochemickými procesy a minimalizovat jejich vliv.*

### **Výzkumný cíl 2: Nové, vysoce citlivé detektory a detekční principy pro EREM.**

**Vedoucí výzkumného cíle:** Ing. Vilém Neděla, Ph.D.

Vývoj nových detektorů, detekčních metod a strategií je nezbytný pro další vývoj EREM v oblasti studia citlivých, často vlhkých nativních biologických a polymerních vzorků za podmínek minimalizujících degradační vlivy PE.

VaV centrum EEM ÚPT AVČR je v současnosti jedním ze světových lídrů v této oblasti. Podaří-li se zvýšit detekční účinnost detektorů např. o 50%, lze získat signál s podstatně vyšším poměrem signálu k šumu a také vyšším rozlišením v obraze, případně lze použít parametry svazku PE šetrnější pro citlivé vzorky (cca poloviční proud svazku) při zachování dostatečného poměru signálu k šumu. Doplníme-li nové, vysoce citlivé detektory špičkovou elektronikou, schopnou přenášet a zesilovat signál ve velké šířce pásma bez zkreslení a rušení, bude možné zobrazovat citlivé vzorky při velké rychlosti rastrování a s minimálním proudem svazku, tedy zatížené nízkou dávkou energie. Nové detektory musí být dále schopny detekovat energiově separovaný signál v podmínkách vysokého tlaku plynů EREM a také signál emitovaný ze vzorku pod určitým úhlem. V kombinaci s možností zobrazovat vzorky v nativním stavu bude možné v EREM studovat nové kontrasty nebo kontrasty doposud nezobrazitelné, stejně tak jako získávat nové informace o dynamice dějů v biologických, chemických vzorcích a ledu

***Tato aktivita se skládá z následujících oblastí:***

**Optimalizace činnosti MC programu, který bude dále využíván pro výzkum a vývoj detektorů.**

V úvodní části budou aktivity navazovat na výsledky výzkumného cíle 1. MC software bude využit pro fyzikální popis procesů provázející interakce ze vzorku emitovaných signálních elektronů s plynem a materiálem detekčních elektrod v EREM.

Poté bude probíhat řada experimentálních měření závislosti detekovaného signálu ionizačním detektorem na tlaku plynu, napětí na detekčních elektrodách detektoru atd. v EREM. Výsledky umožní nastavit další konstanty vyvíjeného MC programu, jako například rychlost dozírání ionizačních a excitačních procesů a celkově sesouhlasit simulovaná a experimentální data pro známé konfigurace již testovaných geometrií detektorů. Na základě simulací koncentrace kladných iontů v prostoru mezi vzorkem a detektorem budou optimalizovány pozice detekčních elektrod a budou nově popsány a lépe pochopeny rekombinační procesy v částečně ionizované plazmě a budou studovány možnosti jejich řízení v komoře vzorku EREM. Přítomnost kladných iontů na jedné straně umožňuje kompenzaci záporného náboje na povrchu vzorku po dopadu primárního elektronového svazku, na straně druhé snižuje účinnost násobení signálu v procesu lavinové ionizace. Na základě výše uvedených postupů bude optimalizována činnost MC programu pro simulace nárazové ionizace molekul plynu signálními elektrony, kaskádové násobení signálu, optimalizace parametrů EREM s cílem dosáhnout maximálního násobení signálu mezi vzorkem a detektorem, který bude dále využíván pro výzkum a vývoj detektorů. VaV centrum EEM je jediným vědeckým centrem na světě, které se v současné době simulacím tohoto druhu věnuje.

**Vývoj různých detektorů pracujících na principu ionizace plynu.**

Tyto detektory budou vyvíjeny s cílem detekovat velmi slabé signály ze vzorků s nízkými koeficienty emise, případně detekovat signály emitované do lokálního prostoru se specifickou energií. Součástí této aktivity bude simulace trajektorií elektronů v kombinovaném elektrostatickém a magnetickém poli v plynu, optimalizace geometrie elektrod, výpočet intenzity elektrostatických a magnetických polí detektoru, návrh geometrie detekčních elektrod. Bude realizován výzkum a vývoj nové, třetí generace patentovaného detektoru ISEDS a následná integrace kompletního detektoru s předzesilovačem do HR-EREM QUANTA 650

FEG. Bude vvinut multimódový režim používání detektoru, jeho detekce v pozici in-lense a v komoře vzorku, energiová filtrace detekovaných elektronů, MC simulace hloubky vzniku informace detekovaných elektronů o specifické energii.

Dalším významným přínosem bude výzkum a vývoj speciálních zesilovačů signálu, které umožní připojení několika detekčních elektrod současně. Pouhým přepnutím bude možné získat signál z různých míst kolem vzorku tedy signál nesoucích prostorovou informaci.

#### **Milníky:**

Díky novým detektorům přestane být EREM metodou umožňující s vysokým rozlišením zobrazit především morfologii a materiálový kontrast. Předpokládá se realizace 3D snímání povrchu vzorku a nalezení nových typů. Výstupy budou prezentovány formou minimálně 4 odporných publikací (*typ výsledku 2 02 11*).

**1)** Třetí generace detektoru v rovině vzorku ISEDS III. *Jeden z nejúčinnějších detektorů sekundárních elektronů pro EREM, kompletně nezávislý na typu mikroskopu, umožňující energiovou separaci detekovaných elektronů.*

**2)** Nový energiově selektivní detektor umožňující rozlišit nejen nové typy kontrastů, ale také přibližné místo jejich vzniku pod povrchem v látce. *Na základě zcela nové koncepce detekce budou detekovány elektrony v závislosti na jejich energii i prostorové emisi.*

**3)** Nový multipoziční ionizační detektor pro EREM. *3D tomografie detekcí elektronů emitovaných pod specifickými úhly ze vzorku.*

**4)** Nový ionizační detektor umístěný pod vzorkem, pro STEM a Wet-STEM mód v EREM. *Výsledek bude umožňovat získ nových informací o tenkých vlhkých vzorcích s přesahem do korelativních technik zobrazení vnitřní a vnější struktury vzorků.*

**5)** Nový ionizační detektor využívajícího cíleně proudícího plynu k zvýšení účinnosti lavinového násobení signálních elektronů v EREM. *Zcela nová koncepce detektoru pro vysoce-účinnou detekci v EREM.*

### **Výzkumný cíl 3: Nové metody pro charakterizaci vysoce citlivých vzorků, dynamické in-situ experimenty.**

**Vedoucí výzkumného cíle:** Ing. Peter Gemeiner, DrSc..

Jednou z nejperspektivnějších oblastí vědy a výzkumu z hlediska budoucích aplikačních možností EREM je studium živých, velmi citlivých nativních a přirozeně vlhkých vzorků, případně speciálních vzorků, např. ledu. Vzorky lze studovat staticky, nebo v dynamicky se měnících podmínkách, na hranici fází a při fázových přechodech, nebo při působení různých fyzikálních a chemických vlivů in-situ v komoře vzorku EREM.

Tato oblast výzkumu představuje komplementární aktivitu k výzkumu partnerů projektu, která umožní získ zcela unikátních výsledků, nedosažitelných metodami, které partneři běžně používají. Vzhledem k obsáhlosti problematiky a rozsahu zapojení partnerů bude pro zvýšení přehlednosti použito dělení do následujících 3 aktivit.

**Aktivita 1: Studium citlivých, převážně biologických a vysoce vlhkých vzorků v EREM v podmínkách termodynamické rovnováhy, bez předchozí chemické fixace či sušení.**

**Vedoucí aktivity:** Ing. Vilém Neděla, Ph.D..

Koncepce nových metod pro studium nativních biologických a vlhkých polymerních vzorků v EREM vycházejí z nejnovějších výsledků VaV EEM a ukazují, absence chemických úprav a pokovení povrchu vzorku umožňuje pozorovat nové kontrasty odpovídající lokálnímu nahromadění chemických látek v podpovrchových vrstvách biologických vzorků, ale také nanometrové biopolymerní vrstev na povrchu vzorků. Pozorování výše uvedených vzorků

s vysokým rozlišením v EREM naráží na značné problémy dané potřebou nastavit a dlouhodobě udržet termodynamickou rovnováhu prostředí na povrchu různých vzorků.

Dlouhodobá stabilizace termodynamické rovnováhy je otázkou přesného nastavení prostředí na povrchu různých vzorků (různá tepelná kapacita, rozměry, hustota materiálu, vodivost a členitost povrchu vzorku) a to i při prudkých změnách tlaku plynu před a po pozorování v mikroskopu. Zásadním faktorem ovlivňujícím výslednou teplotu povrchu vzorku je ohřev elektronovým svazkem a chlazení držákem vzorku. Účinnost chlazení dále závisí na ploše vzorku a jeho kontaktu s chlazeným držákem, tepelné vodivosti vzorku, odvozech tepla vodní vrstvou, atd. Všechny tyto procesy budou obecně popsány a poté v závislosti na parametrech elektronového svazku, typu vzorku a řadě dalších výše uvedených faktorů kvantifikovány. S využitím programu ANSIS bude přesně popsáno rozložení tlaku plynu a rychlosti jeho proudění v blízkosti povrchu vzorku.

Dále bude aktivita zaměřena na realizaci měření reálné teploty na povrchu vzorků, jejíž výpočet je vzhledem k rozdílným velikostem, chemickému složení i fyzikálním vlastnostem vzorků komplikovaný, zdoluhavý a vždy platný jen pro jeden konkrétní vzorek a parametry mikroskopu. Pomocí simulací v programu ANSIS budou přesně popsány relevantní mechanismy vedení tepla vzorkem, vedení tepla vrstvou vody a kontaktem s chlazenou podložkou. Ve spolupráci s partnerskými VaV pracovišti ÚEB AV ČR, IKEM a SUPRAMOL ÚMCH AV ČR budou v programu ANSIS simulovány a přesně popsány teplotní závislosti vybrané skupiny konkrétních biologických a polymerních vzorků v „reálném“ prostředí komory vzorku EREM a při pozorování vzorku svazkem PE.

Vzhledem k tomu, že vzdálenost objektivu mikroskopu od vzorku je v jednotkách milimetrů, je měření teploty velmi obtížné a bude proto navržena implementace mikrosenzorů pro měření teploty, tlaku a vlhkosti plynu na chlazený držák vzorku. Pro měření přesné teploty povrchu vzorku bude navržena a realizována metoda přímého měření teploty vzorku čítající integraci přesné infračervené kamery do komory vzorku. Kombinace těchto metod umožní přímé měření klíčových parametrů v průběhu experimentů a poskytne informace o teplotním vlivu svazku PE a případném svodu tepla mikrovrstvou vody.

Ve spolupráci s partnerskými VaV pracovišti ÚEB AV ČR, SUPRAMOL ÚMCH AV ČR a IKEM budou vyvinuty nové metodiky studia specifických vzorků v EREM viz Obr. 5.3.4. Výsledky výzkumu řízení termodynamické rovnováhy v EREM v kombinaci s novým držákem vzorku umožní studium širokého spektra vzorků partnerů projektu - rostlinné vzorky (ÚEB AV ČR), živočišných vzorků (IKEM), polymery (SUPRAMOL ÚMCH AV ČR).

#### **Milníky:**

**1)** Realizace měření teploty vzorku, tlaku a vlhkosti plynu v blízkosti povrchu vzorku v EREM. *Výsledek umožní vývoj nových metod pro studium citlivých biologických vzorků a zejména unikátní experimenty v oblasti zkoumání ledu.*

**2)** Fyzikální popis rozložení tlaku plynu a rychlosti jeho proudění v blízkosti povrchu vzorku a jeho vlivu na tepelné změny vzorku, dále popis relevantních mechanismů vedení tepla vzorkem, vrstvou vody a kontaktem s chlazenou podložkou v prostředí EREM. *Výsledek umožní vývoj nových metod pro studium citlivých biologických a polymerních vzorků.*

**3)** Popis teplotní závislosti vybrané skupiny biologických a polymerních vzorků v „reálném“ prostředí komory vzorku EREM a při pozorování vzorku svazkem PE. *Výsledek umožní vývoj nadstavbových metod pro pozorování s teplotou měnících se vzorků v rámci dynamických in-situ experimentů.*

**Aktivita 2: Charakterizace morfologie povrchu biologických vzorků chlazených na záporné teploty v řádu jednotek až desítek °C a studium ledu při teplotách do -280°C.**

**Vedoucí aktivity:** Mgr. Dominik Heger, Ph.D.

Klíčovou aktivitou této oblasti výzkumu bude vývoj nového chlazeného držáku vzorku schopného chladit vzorky až na teplotu -70°C a vývoj vysoce sofistikovaného systému pro chlazení vzorků ledu do teplot tekutého dusíku či hélia. Komerčně dostupné držáky vzorku zcela nedosahují kvalit potřebných pro níže navržené experimenty. Kritickým parametrem není jen požadovaná teplota, ale také míra její stability, možnost regulace rychlosti náběhu teploty, vysoká chladicí kapacita zajišťující prochlazení i objemovějších vzorků a v neposlední řadě opakovatelnost výše uvedených parametrů. Součástí aktivity bude také vývoj řídicí elektroniky a instalace celého systému do komory vzorku EREM.

Velmi přesná regulace teploty pod -20 °C je nezbytná pro další vývoj metody umožňující studium morfologie nejen rostlinných vzorků v podmínkách nízké relativní vlhkosti v komoře vzorku, nazývané Low Temperature methode (LTM). Na základě nového vybavení bude možno tuto metodu dále rozvíjet směrem k minimalizaci poškození vnitřní struktury vzorku a možnosti studia ultrastruktury. Na základě vývoje doplňků k stávajícím mikromanipulátorům bude vyvíjena nová technika metody přípravy biologických vzorků metodami in-situ mrazové sublimace a mrazového lámání s využitím mikromanipulátorů přímo v komoře vzorku mikroskopu, tzv. LT-EREM.

Systém pro chlazení vzorků ledu do teplot tekutého dusíku či hélia bude následně využit pro přímého studium zmrzlých ledových vzorků za podmínek velmi blízkým přírodním. Za tímto účelem bude zdokonalena stávající metodika pozorování ledu. Budou sledovány procesy tuhnutí, metamorfie a tání vzorků ledů za účelem pochopení těchto dějů v přírodním ledu a sněhu; bude srovnáván přírodní led a sníh charakteristický pro arktické i přímořské oblasti, bude charakterizováno chování ledových květů při jejich sublimaci. Na závěr bude realizována doposud nevyužitá možnost nečistoty sledovat přímo ve zmrzlém stavu na hranách ledových zrn a opatřit je X-ray prvkovou analýzou a fluorescenční analýzou.

Metodiku studia silně podchlazených vzorků bude využita při studium širokého spektra vzorků partnerů projektu – mrazové poškození rostlin (VaV centrum ÚEB AV ČR), stabilizace farmaceutických biomakromolekul a dynamika fázových změn biomimetických systémů (SUPRAMOL ÚMCH AV ČR). Ve spolupráci s VaV partnerem projektu IKEM bude studována možnost použití kryoprotektantů a optimalizace studia živočišných buněk v tzv. LT-EREM.

**Milníky:**

- 1)** Chlazený držáku vzorku s velmi přesnou regulací teploty až do -70°C.
- 2)** Chlazený držák vzorku pro studium ledu při teplotě do -280°C. *Umožní realizaci speciálních experimentů při zkoumání struktury čistého a kontaminovaného ledu.*
- 3)** Zdokonalení metodiky pozorování ledu, popis procesů tuhnutí, metamorfie a tání vzorků ledů, charakterizace chování ledových květů při jejich sublimaci.
- 4)** Vytvoření metodiky pro datování vzorků z ledovcových vrtů korelativní X-ray prvkovou analýzou a fluorescenční analýzou.
- 5)** Nové doplňkové nástroje pro mikromanipulační a mikroinjekční techniky specificky vyvinuté pro studium vnější i vnitřní struktury a dynamické in-situ experimenty konkrétních vzorků partnerů projektu. *Speciální injektory, mikronožky atd. vytvořené pro konkrétní potřeby partnerů projektu umožní nové pohledy na stávající problematiku.*

6) Nová technika metody přípravy biologických vzorků metodami in-situ mrazové sublimace a mrazového lámání v komoře vzorku mikroskopu (LT-EREM) *Metoda umožní studium struktury hluboce zmrazeného vzorku připraveného přímo v komoře mikroskopu, vzorek bude stabilizován co nejlépe nativnímu stavu bez nutnosti nákladného a komplikovaného kryzařízení.*

**Aktivita 3: Charakterizace morfologie vnitřní a vnější struktury bio-polymerních kapslí obsahujících živé buňky i bez buněk.**

**Vedoucí aktivity: Ing. Peter Gemeiner DrSc a Ing. Marek Bučko, Ph.D.**

V současné době je VaV centrum EEM jediné na světě, které je schopno pomocí unikátního EREM studovat povrchovou morfologii přirozeně vlhkých nativních bio-polymerových kapslí obsahujících polotekuté jádro s živými buňkami bez poškození.

Uvedená možnost pozorovat nano-morfologii a vnitřní uspořádání polymerních kapslí a částic s imobilizovanými buňkami ve vysokém rozlišení a v nativním stavu bez invazivních úprav bude využita pro další vývoj a studium vlastností nových imobilizovaných biokatalyzátorů obsahujících živé buňky. Vývojem inovativních imobilizačních postupů s využitím EREM se očekává získání nových poznatků z hlediska morfologie a funkčních vlastností imobilizátorů. Technika EREM bude využita pro charakterizaci povrchu vzorků, určení geometrie částic a studium vzorků s velmi vysokým rozlišením. Tyto studie budou rozlišeny o výzkum morfologie vnějších a vnitřních stěn kapslí a částic a stavu buněk po otevření částic mikromanipulátorem, in-situ reakcí materiálu částice s vybranými chemickými látkami a studium pórů pomocí WetSTEM. Korelativní mikroskopie umožní studium vzorků částic a kapslí s EREM a fluorescenčním optickým mikroskopem s velmi vysokým rozlišením a hloubkou ostrosti při současném záznamu dat specifických pro optickou mikroskopii. Předpokládá se realizace dynamických in-situ experimentů zaměřených na morfologickou charakterizaci polymerů v závislosti na vnějších vlivech (teplota, tlak, záření, ...). Ve spolupráci s partnerským pracovištěm SUPRAMOL ÚMCH AV ČR budou realizovány funkční testy radiačního poškození bio-polymerů a budou studovány možnosti kompenzace volných radikálů.

Technika EREM bude využita i v oblasti vývoje pokročilých a vysoce výkonných biočipů a biosenzorů zaměřených na sledování změny glykozylačního statutu povrchů buněk, které je v úzké korelaci s převážnou většinou biologických (fyziologických i patologických) procesů kterých se buňka zúčastňuje. Oblast výzkumu, přípravy a využití biočipů a biosenzorů pro (glyko)biorozpoznávání je celosvětově velmi progresivní oblastí. Glykopofilace vzorků tak bude významnou doplňkovou metodou pro charakterizaci vzorků analyzovaných v rámci projektu, včetně vysoce citlivých vzorků, čímž bude zároveň rozšířen aplikační potenciál. Hlavní úsilí bude zaměřeno na vývoj takových biočipových zařízení, které umožní rychlé, vysoce výkonné a citlivé analýzy biologických vzorků s aplikovatelností v biologii, biomedicíně, biotechnologii, při vývoji biomarkerů (např. rakoviny) a při sledování a detekci patogenních mikroorganismů, v kombinaci s pokročilými zobrazovacími technikami. Mikroskopické metody budou využity pro charakterizaci, funkční sledování a testování biočipů a biosenzorů.

**Milníky:**

1) Popis povrchové morfologie přirozeně vlhkých nativních bio-polymerových kapslí obsahujících polotekuté jádro s živými buňkami.

2) Charakterizaci povrchu vzorků, určení geometrie částic a studium vzorků s velmi vysokým rozlišením. Popis morfologie vnějších a vnitřních stěn kapslí a částic a stavu buněk po otevření

částic mikromanipulátorem, in-situ reakcí materiálu částice s vybranými chemickými látkami a studium pórů.

V rámci výzkumného cíle je předpokládáno vydání minimálně 10 odborných publikací (výsledku typu 2 02 11) a 8 odborných publikací se zahraničním spoluautorstvím (výsledku typu 2 02 11).

#### ***Výzkumný cíl 4: Unikátní analytický EREM s vysokým rozlišením - integrace nových systémů a metod, korelativní mikroskopie***

***Vedoucí výzkumného cíle: Ing. Jan Ježek, Ph.D.***

EREM představuje vysoce univerzální nástroj pro studium nano-morfologie a materiálového složení širokého spektra vzorků. Hlavním cílem aktivit této sekce je zlepšit užité vlastnosti EREM z hlediska rozlišení v podmínkách vysokého tlaku plynů a integrovat do něj další pokročilé technologie a metody. Základní vizí této aktivity je v komoře vzorku Advanced analytical HR-EREM vytvořit nano-laboratoř pro přípravu, pozorování a chemické analýzy nativních či živých biologických vzorků a polymerů. Kombinací metod elektronové a optické mikroskopie a spektroskopie v jednom systému bude možné vzorek analyzovat paralelně a získat dobře korelovatelná a vzájemně se doplňující data. Předpokládáme integrovat EREM s optickou fluorescenční mikroskopií, Ramanovou spektroskopií a možnostmi bezkontaktních mikromanipulací využívajících fokusovaných laserových svazků. Bude tak vytvořen světově unikátní analytický nástroj, jehož využití bude garantováno partnery projektu z oblasti rostlinné a živočišné biologie.

***Tato aktivita se skládá z následujících oblastí:***

**Optimalizací designu spodní části objektivu mikroskopu z hlediska čerpání plynu a integracemi nových detektorů.** Bude dosaženo potlačení rozptylu primárního elektronového svazku před vstupem do komory vzorku. Na základě výsledků MC simulací (Výzkumný cíl 1) budou navrženy a realizovány úpravy designu diferencially čerpaných komor a spodní části objektivu EREM a integrace nových detektorů (Výzkumný cíl 2). Tím se podstatně zvýší poměr detekovaného signálu k šumu a vzroste rozlišení mikroskopu. V této části budou využity a realizovány výsledky simulací z předchozích aktivit projektu. Do tubusu EREM budou integrovány nové, vysoce citlivé detektory vyvinuté v rámci výzkumného cíle 2 a mikromanipulační techniky fokusovaným laserovým svazkem pro možnost manipulace vzorku v komoře EREM.

**Nové metody pro selektivní hydrataci, cílenou kompenzaci náboje a pokročilé studium chemicky aktivních látek a bio-chemických reakcí** úzce souvisí s potřebou lokální aplikace kapalin a plynů či odsávání plynů ze vzorku při chemických reakcích nebo při pozorování zvláště komplikovaných vzorků v EREM. Metody budou založeny na pokročilé instrumentaci, vyvinuté na základě výsledků simulací proudění plynů v okolí vzorku, nebo při řízeném a přesně směřovaném proudění plynů v okolí vzorků. Tím bude možné vzorky nejen selektivně vlhčit, případně lokálně zvýšit hydrataci citlivých míst, ale také zvyšovat koncentraci elektronovým svazkem ionizovaného plynu a lépe lokálně kompenzovat náboj na ostrých hranách či výběžcích elektricky nevodivých vzorků při nízkém tlaku plynu v EREM. Naopak bude možné také cíleně odsávat nebezpečné plyny, nebo zvyšovat účinnost lavinového násobení signálu ionizačních detektorů v EREM. Jedná se o metody aplikovatelné za hranic



běžného zkoumání vzorků v EREM a umožňující dosáhnout unikátní výsledky s vysokým rozlišením a při minimálním poškození citlivých vzorků.

**Integrace optické fluorescenční mikroskopie a Ramanovy spektroskopie do EREM** je technologickou výzvou, vzhledem k nutnosti sladit protichůdné požadavky na volný prostor i porty komory vzorku. Cílem této aktivity bude návrh technické řešení a realizace integrace optického fluorescenčního mikroskopu a ramanovského mikrospektrometru do komory vzorku EREM. Současně bude třeba vyvinout systém chlazení objektivu optického mikroskopu pro zajištění přítomnosti imerzní vodní vrstvy mezi objektivem a podložním sklíčkem vzorku v EREM.

Z hlediska vnitřního prostorového uspořádání koliduje s detektory pro STEM a Wet-STEM a proto je nutné tyto detektory nově navrhnout. Nově bude vyvíjen systém integrace těchto detektorů do objektivu světelného mikroskopu, přičemž musí být zajištěna možnost současného použití optického mikroskopu a EREM pracujících v módech STEM a Wet-STEM. Současně bude vyvíjen nový systém ionizačního detektor pro klasickou detekci signálních elektronů v EREM, který bude pracovat současně s výše uvedenými systémy. Realizace těchto systémů je součástí know-how VaV centra EEM ÚPT AVČR.

Výše uvedený analytický nástroj má velký aplikační potenciál pro partnery projektu. Pomocí korelační EREM, fluorescenční a Ramanovy spektroskopie budou studovány ledové vzorky; s využitím kryo-držáku budou mikroskopicky sledovány různé krystalové a amorfní modifikace ledu, popsány jejich fázové změny a zejména jejich vliv na nečistoty v ledu přítomny. Bude možno charakterizovat rozsah a způsob změn koncentrací rozpuštěných látek při mrazení ledu, buněk či biomimetických systémů a tím popsat mrazové poškození za účelem jeho minimalizace. Přímé sledování dynamiky adsorpce molekul na povrch ledu, fázových přeměn, tuhnutí a krystalizace přítomných nečistot, in-situ a měření pH v EREM, defektoskopie polymerů atd.

Ve spolupráci s partnerskými VaV pracovišti budou vyvinuty speciálních techniky korelativní elektronové a světelné mikroskopie pro studium biologických vzorků a citlivých polymerů (SUPRAMOL ÚMCH AV ČR), optimalizovány metody a postupy korelativní mikroskopie (ÚEB AV ČR) a optimalizovány přípravy živočišných vzorků a metodika jejich imunoznačení pro korelativní mikroskopii (IKEM).

#### **Milníky:**

Vzhledem k silné mezioborové spolupráci se předpokládá vydání minimálně 6 odborných publikací (*výsledku typu 2 02 11*) a 3 odborných publikací se zahraničním spoluautorstvím (*výsledku typu 2 02 11*).

**1)** Nový design diferenciálně čerpaných komor a spodní části objektivu EREM umožňující integraci nových detektorů a integraci optického mikroskopu. *Umožní zvýšit rozlišení EREM, detekovat doposud nedetekovatelné slabé signály a energiově separované signály do tlaku plynu 500Pa, příprava pro integraci optického mikroskopu.*

**2)** Instrumentace pro vysoce účinnou selektivní hydrataci vzorků, lokální kompenzaci náboje nezbytná pro studium chemicky aktivních látek a chemických reakcí v komoře vzorku EREM. *Umožní pozorovat silně vysychající a nehomogenně vysychající vzorky, vzorky silně se nabíjející, případně studovat chemické reakce na základě lokální injektáže kapalin a plynů.*

**3)** Integrace optického fluorescenčního mikroskopu a ramanovského mikrospektrometru do komory vzorku EREM.

**4)** Realizace systému chlazení objektivu optického mikroskopu pro zajištění přítomnosti imerzní vodní vrstvy mezi objektivem a podložním sklíčkem vzorku v EREM. *Systém umožní*

*práci s vysokým rozlišením v imerzním i neimerzním módu, optický mikroskop bude mechanicky nezávislý tudíž dobře seřiditelný pro přesnou korelaci obrazů.*

**5)** Detektor signálních elektronů pro možnost současného snímání optického obrazu vzorku a detekci odražených signálních elektronů v EREM. *Výsledek umožní paralelní zobrazení vzorků různými mikroskopickými technikami)*

**6)** Speciální detektor signálních elektronů pro možnost současného snímání optického obrazu vzorku a detekci prošlých elektronů v módu Wet-STEM. *Výsledek umožní paralelní zobrazení vzorků různými mikroskopickými technikami)*

**7)** Realizace řady dynamických in-situ experimentů v módu kombinované elektronové a světelné mikroskopie, Ramanovy spektroskopie.

#### 5.3.4. Mezinárodní spolupráce

VaV centrum EEM, jenž bude v projektu zajišťovat realizaci výzkumného programu 3, má navázány úzké kontakty se světovou elitou vědců z oblasti environmentální elektronové mikroskopie, jako je např. Dr. Debbie Stokes (University of Cambridge), prof. Brandon Griffin (Oak Ridge Natl Lab, USA), prof. Miloš Toth (University of Technology, Sydney, AUS), prof. Brandley Thiel (University at Albany, College of Nanoscale Science and Engineering), i elitními vědci z oblastí použití speciálních elektronově mikroskopických technik, jako např. prof. Takanori Koshikawa (Fundamental Electronics Research Institute Osaka Electro-Communication University Osaka, Japan), prof. Makoto Shiojiri (Kyoto Institute of Technology, Japan) a prof. Witold Słowko (Faculty of Microsystem Electronics and Photonics, Wrocław University of Science Technology). Tyto významné osobnosti vyjádřili podporu a také přislíbili vědeckou spolupráci na předkládaném projektu, viz příloha 6. Na základě smlouvy o spolupráci VaV centrum EEM také spolupracovalo se zakladatelem EREM, Dr. Danilatem (ESEM Research Laboratory, Sydney, AUS). Tématem spolupráce byl vývoj a výzkum nových technologií v oblasti EREM. Výsledkem výše uvedených spoluprací bylo několik impaktovaný článků. VaV centrum EEM má bohaté zkušenosti s řešením grantových projektů většiny českých grantových agentur a ministerstev (GAČR, TAČR, MŠMT, MPO) i projektů dotovaných EU. Do řešení těchto projektů byli zapojeni výše uvedení zahraniční vědci představující světovou špičku v oblasti výzkumu a vývoje REM i EREM. V rámci projektu MŠMT, OPVK, CZ.1.07/2.3.00/20.0103, jehož bylo centrum řešitelem, byl do ÚPT AVČR z Německa reintegrovan zahraniční vědec Dr. Krzyżánek. Podporu předkládanému projektu také deklaruje firma FEI Czech Republic prostřednictvím generálního manažera Jiřího Očadlíka, firma JEOL USA inc. prostřednictvím Dr. Masahiro Kawasakiho, Director of TEM applications and Business Solutions Americas, firma AutraDet Company prostřednictvím generálního ředitele Ing. Romana, MBA a firma TECPA prostřednictvím vlastníka Vladimíra Palupy, viz příloha 6.

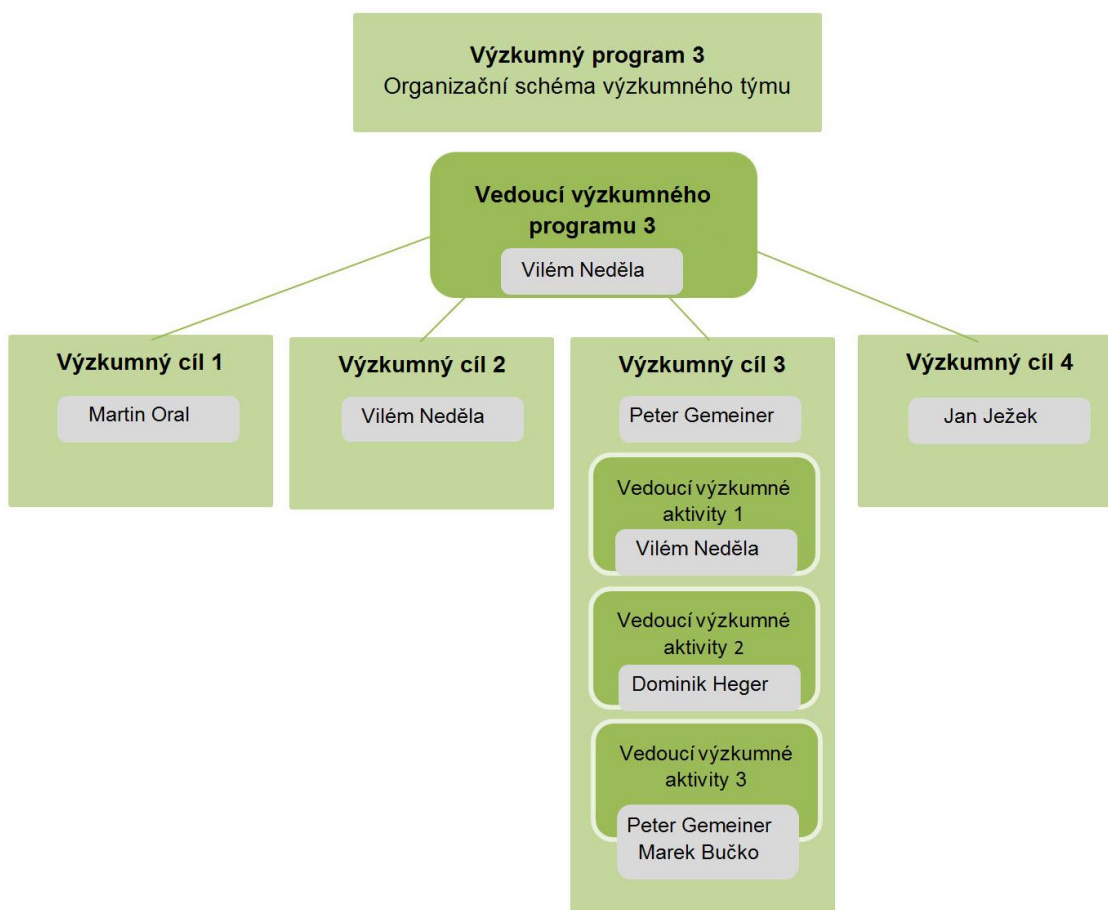
Ve výzkumném programu 3 bude mezinárodní spolupráce rozšířena díky účasti Ing. Petera Gemeinera, DrSc, jež dlouhodobě spolupracuje na tématice studia morfologie a vlastností polyelektrolytových kapslí a částic pro vývoj a charakterizaci imobilizovaných biokatalyzátorů s předními světovými odborníky, jež vyjádřili podporu předkládanému projektu, jako je např. prof. Thomas Heinze (Institut für Organische Chemie und Makro-molekulare Chemie, Jena, Germany), prof. Roberto Fernandez Lafuente (Instituto De Catálisis y Petroleoquímica, Madrid, Spain), prof. Salvatore Desantis University of Bari Aldo Moro, Italy) a prof. Marko D. Mihovilovic (Institute for Applied Synthetic Chemistry, TU Vienna), viz příloha 6. Také účast Mgr. Dominka Hegera Ph.D. na výzkumném programu Nové metody a zařízení pro vysokorozlišovací mikroskopii a chemickou analýzu vysoce citlivých nativních biologických

vzorků přinese rozšíření mezinárodní spolupráce. Mgr. Dominik Heger, Ph.D. dlouhodobě spolupracuje na tématice studia ledu s Kiate Kimem (Senior Research Scientist, Korea Polar Reserch Institute, Korea), prof. Thomasem Loertingem (Institute of Physical Chemistry, University of Innsbruck) a Dr. Xinem Yangem (Brithis Antarctic Survey). Rovněž tito světoví odborníci na studium ledu slíbili vědeckou účast na předkládaném projektu, viz příloha 6.

### 5.3.5. Výzkumný tým

#### **Složení výzkumného týmu, role, výzkumné aktivity a harmonogram náboru**

Přehled všech jmenovitě nominovaných členů výzkumného týmu a členů, kteří budou nominováni, je uveden v tabulce (Tab. 5.3.1) s uvedením jejich role v projektu, H indexem and FTEs (full time equivalent). Pro každého jmenovitě uvedeného člena týmu je připojeno CV (příloha 7). Tato CV uvádí expertízu pracovníků, nejlepších 8 publikací s citacemi a další relevantní informace, vše ve vztahu k předkládanému návrhu (příloha 7).



**Obrázek 5.3.5: Organizační schéma výzkumného týmu výzkumného programu 3.** Vedoucí výzkumného programu bude odpovědný za koordinaci aktivit vedoucího výzkumných pracovníků.

**Ing. et Ing. Vilém Neděla, Ph.D., klíčový vedoucí vědecký pracovník (2017-2022),** je zakladatel a vedoucí výzkumných skupin Detekční systémy a později Environmentální elektronová mikroskopie na ÚPT AVČR. Téměř dvacetiletá praxe v oboru elektronová mikroskopie. Specialista na výzkum a vývoj detekčních systémů pro rastrovací elektronovou mikroskopii (REM) a environmentální rastrovací elektronovou mikroskopii (EREM). Zkušenosti

v oblasti Monte Carlo simulací, simulací proudění plynu v EREM, speciálních metod a technik pro EREM, integrací nových technologií do EREM. Vedoucí dvou laboratoří environmentální elektronové mikroskopie v UPT AVČR. Publikoval více než 30 článků s IF. Podílel se, nebo vyvinul 9 typů detektorů pro elektronové mikroskopy. Autor řady nových metod pro studium citlivých vzorků v EREM. Autor přestavby elektronového mikroskopu Vega (Tescan) na experimentální EREM AQUASEM II. Autor řady prototypů a 2 patentů. Řešitel řady vědeckých a výzkumných projektů. Podrobný popis aktivit a výsledků viz životopis (příloha 7). V projektu celkově zodpovědný za Výzkumný program 3. Zodpovědný za cíl 2 a aktivitu 1 v cíli 3. Spoluzodpovědný za cíl 4.

**Ing. Peter Gemeiner, DrSc., excelentní vědecký pracovník (2017-2022)**, bude nově přijatý excelentní vědec. Ing. Peter Gemeiner, DrSc. je excelentní vědecký pracovník, má 35-leté zkušenosti v různých oblastech imobilizovaných biotechnologií, biosenzorů biorozpoznávacích technik a lektinologie. Je spoluautorem 2 monografií, 7 kapitol v knihách, cca 210 publikací v CC časopisech, 30 patentů a autorských osvědčení, má cca 2800 citací, Hirschův index jeho prací je 29. Vyškolicil 16 doktorandů a vedl 25 diplomových prací. Je školitelem-specialistou 1 doktoranda. Účastnil se jako vedoucí slovenské skupiny mezinárodních projektů FP4 EC Brusel (Programy PECO 1992, Copernicus 1994, INCO Copernicus 1997/98, FP5 (QoL), COST 1998-2016 (5)). Byl vedoucím národních projektů GAV, VEGA, APVT/APVV. Podílel se na řešení projektů SF OPVaV. Byl zodpovědným řešitelem smluvní spolupráce s firmami Whatman plc, Biotika a.s., LIKO a.s., Biocel a.s., Iontosorb s.r.o., BCS Engineering a.s, Ing. Stanislav Krčmař, CSc. (Moravské Bránice), Biorealis s.r.o. a Axxence Slovakia s.r.o. Podrobný popis aktivit a výsledků viz životopis (příloha 7). Ve výzkumném programu 3 celkově zodpovědný za cíl 3 a aktivitu 3, dílčí zodpovědnost za vývoj imobilizovaných celobuněčných biokatalyzátorů a přípravy vzorků pro charakterizaci environmentální elektronovou mikroskopií a dalšími zobrazovacími technikami.

**Ing. Marek Bučko, Ph.D., klíčový vědecký pracovník (2017-2022)**, bude nově přijatý klíčový vědecký pracovník. Ing. Marek Bučko, PhD. je samostatný vědecký pracovník. Disertační práci z oblasti biotechnologie „Imobilizované biosystémy: potenciál a omezení imobilizace biokatalyzátorů v polymerních mikrokapslích“ obhájil v roce 2008. Je spoluautorem 22 CC prací citovaných 327 krát, Hirschův index prací má 11. Vedl 1 projekt agentury APVV, je vedoucí 1 projektu VEGA, podílel se na řešení projektů ŠF OPVaV, APVT, APVV, VEGA, COST, Blokový grant SAV. Vyškolicil 1 doktorandku, je školitelem 1 doktoranda. Podrobný popis aktivit a výsledků viz životopis (příloha 7). Ve výzkumném programu 3, cíl 3 zodpovědný za aktivitu 3 zodpovědný za vývoj imobilizovaných celobuněčných biokatalyzátorů a přípravu vzorků pro charakterizaci environmentální elektronovou mikroskopií a dalšími zobrazovacími technikami.

**Ing. Jaroslav Katrlík, Ph.D., vědecký pracovník - senior (2017-2022)**, bude nově přijatý vědecký pracovník. Ing. Jaroslav Katrlík, PhD. je samostatný vědecký pracovník s mnohaletými zkušenostmi v oblasti analytické a bioanalytické chemie a glykomiky se zaměřením na výzkum, vývoj a aplikace biosenzorů a biočipů. Je spoluautorem 30 prací citovaných více než 400 krát, 3 kapitol v knihách, Hirschův index prací má 14. Vyškolicil 1 doktoranda, byl školitelem-specialistou 1 doktoranda, je školitelem 2 doktorandů a vedl 12 diplomových prací. Je zástupcem vedoucího slovenské skupiny v mezinárodních projektech FP7-PEOPLE-2012-ITN a QNRF NPRP, podílel se na řešení projektu FP5 a projektů COST. Vedl/vede 3 projekty agentury APVV, 1 projekt VEGA, podílel se na řešení projektů ŠF OPVaV, APVT, APVV a VEGA. Úspěšně se zúčastnil mezinárodních soutěží podnikatelských plánů zaměřených na aplikace výzkumu z oblasti nanotechnologií a biotechnologií ("Nanochallenge 2006", Padova, Itálie - člen vítězného týmu; "From research to enterprise", Středoevropská iniciativa, Terst, Itálie, 2006 -

vedoucí vítězného týmu). Podrobný popis aktivit a výsledků viz životopis (příloha 7). V rámci cíle 3 zodpovědný za vývoj, charakterizaci použití pokročilých a vysokovýkonných biočipů a biosenzorů pro glykorozpoznávání proteinů a buněk.

**Mgr. Dominik Heger, Ph.D., klíčový vědecký pracovník (2017-2022)**, bude nově přijatý klíčový vědecký pracovník. Mgr. Dominik Heger, Ph.D. je vedoucí Ice Photochemistry teamu zabývající se (foto)chemií a (foto)fyzikou ledu a mechanismy transformací (organických) látek. Expert na optickou spektroskopii: UV-Vis absorpční a difusně reflexní, fluorescenční, transienční spektroskopii a na zpracování experimentálních dat. Má široké vědecké zájmy sahající od organické mechanické chemie přes fotochemii a spektroskopii až po fyziku ledu. Společně s dalšími vybudoval laboratoř časově rozlišené spektroskopie pokrývající od femtosekund po hodiny: pump-probe spektroskopie, nanosekundová záblesková fotolýza, časově rozlišená fluorescence. Autor nebo spoluautor více než 30 recenzovaných článků, s h-indexem 14 a průměrným citačním ohlasem na článek 16.2. Podrobný popis aktivit a výsledků viz životopis (příloha 7). Zodpovědný za cíl 3 Aktivita 2. Garant tematiky studium ledu pomocí mikroskopických a optických metod v návaznosti na aplikace pro chemii životního prostředí a farmacii.

**Ing. Jan Ježek, Ph.D., vědecký pracovník - senior (2017-2022)**, je člen skupiny Optických mikromanipulačních technik zabývající se využitím mechanických účinků laserového záření při jeho interakci s dielektrickými objekty, Ramanovou spektroskopií, dvoufotonovou polymerací a mikrofluidními systémy. Expert na návrh a konstrukci optických a optomechanických systémů, Ramanovu mikrospektroskopii a mikrofluidní systémy. Společně s dalšími navrhl a sestavil několik funkčních optických sestav pro laserové mikromanipulační techniky, sestavy pro Ramanovu spektroskopii, vysoce stabilní mikroskop pro měření sil v optických pastech, fluorescenční Lightsheet mikroskop a další systémy. Autor nebo spoluautor 15 recenzovaných článků s h-indexem 8, jednoho užitného vzoru a 19 funkčních vzorků. Podrobný popis aktivit a výsledků viz životopis (příloha 7). Celkově zodpovědný za Cíl 4. Expert na integraci optického fluorescenčního mikroskopu, Ramanova spektrometru a laserových mikromanipulačních technik do EREM. Zodpovědný za výzkum a vývoj nových metod při využití do EREM integrovaných, výše uvedených technik.

**Ing. Ivo Konvalina, Ph.D., vědecký pracovník - junior (2017-2022)**, je vědecký pracovník s mnohaletými zkušenostmi v oblasti návrhu a studia elektronově-optických systémů se zaměřením zejména na detekční systémy. Zabývá se výpočty rozložení elektrostatických a magnetických polí v elektronových mikroskopech vysokorozlišovacích, nízkonapěťových i environmentálních. Zkušenosti s Monte Carlo simulacemi a trasováním částic uplatnil při návrzích nových detekčních systémů i při studiu vlastností stávajících systémů s ohledem na kontrastní mechanismy tvorby obrazu. Je autorem desítek publikací v impaktovaných či odborných časopisech. V rámci cíle 1 spolu-zodpovědný za simulace interakcí elektronového svazku s plynem kapalinou a pevnou látkou. MC simulace trajektorií signálních elektronů v plynu, simulace procesů násobení signálu v plynu, spolupráce při návrhu a optimalizacích nových detektorů v přímé návaznosti na výsledky simulací. Spolupráce při vývoji nového komplexního MC softwaru pro EREM.

**Mgr. Martin Oral, Ph.D., vědecký pracovník - senior (2017-2022)**, je člen skupiny Elektronová optika, zabývá se teorií a simulacemi v optice nabitých částic a návrhem částicově-optických zařízení. Expert na přesné a efektivní výpočty trajektorií v elektrických a magnetických polích, systémů pro fokusaci a zpracování svazků nabitých částic. Navrhl způsob korekce deformace iontové stopy na nakloněném vzorku ve spektrometru ToF, vychylovací systém s posunutým středem vychylování pro environmentální rastrovací elektronový

mikroskop a podílel se návrzích řady dalších zařízení. Je autorem metod pro výpočet aberačních koeficientů obecných částicově-optických soustav a pro korektní výpočet rozložení proudové hustoty ve svazcích částic. Vyvinul programovou knihovnu pro rychlé a paralelizovatelné výpočty přesných trajektorií částic. Je autorem nebo spoluautorem 16 recenzovaných článků s h-indexem 2. Podrobný popis aktivit a výsledků viz životopis (příloha 7). Celkově zodpovědný za cíl 1 - Simulace interakcí elektronového svazku s plynem kapalinou a pevnou látkou. Vytvoření programového kódu pro komplexní Monte Carlo software pro EREM, aplikace výsledného kódu, na řešenou problematiku, integrace dat z dalších speciálních programů, zejména pro simulaci rychlosti a tlaku plynu, přestupu tepla, atd.

**Doc. Ing. Mgr. Jiří Maxa, Ph.D., vědecký pracovník - junior (2017-2022)**, je vědecký pracovník, má 28-leté zkušenosti v oblasti konstrukce zařízení včetně 3D objemového modelování a následných matematicko-fyzikálních analýz. Podílel se konstrukčními a analytickými pracemi při vývoji diferenciální čerpané komory a detektorů pro EREM, hydratačního zařízení pro komoru vzorku. Vyškoli 1 doktoranda, je školitelem 5ti doktorandů a vedl 30 diplomových a bakalářských prací. Podílel se na grantech: GAČR - GA101/95/0074 - Metodika výuky CAD na technických vysokých školách. GAČR - GA102/01/1271 - Studium detekčních metod a systémů v hraničních podmínkách environmentální rastrovací elektronové mikroskopie. GA AV ČR, KJB200650602 - Detekční systém pro záznam signálů čistých sekundárních nebo zpětně odražených elektronů v EREM. GA 102/05/0886 - Výzkum detekčních systémů pravých sekundárních elektronů v nově koncipovaném environmentálním rastrovacím elektronovém mikroskopu. OPVK-CZ.1.07/2.2.00/28.0193. V rámci cíle 1 a 3 bude spolu-zodpovědný za simulace rychlosti proudění a tlaků plynů v EREM, za simulace přenosu tepla v okolí vzorku EREM. Zodpovědný za návrh designu nových systémů pro speciální mikro-manipulace, mikro-injektáž kapalin a plynů a nových detektorů pro EREM, jakožto i pro nové konstrukční modifikace EREM pomocí CAD systémů a specializovaných softwarových modulů.

**Ing. Eva Navrátilová, Ph.D., vědecký pracovník - junior (2018-2022)**, je člen výzkumné skupiny EEM na ÚPT AVČR. Aktivně se podílela na řešení několika projektů: 3 projektů GAČR a 1 projektu MPO. V roce 2015 získala mzdovou podporu z programu podpory perspektivních lidských zdrojů – Mzdová podpora postdoktorandů na pracovištích AVČR. V rámci cílů 1 a 4 spolu-zodpovědná za vývoj a testování vývoji nového MC softwaru a metod pro studium biopolymerových kapslí a částic. Spolupráce při realizaci speciálních a dynamických experimentů v EREM a aplikací korelačně mikroskopických technik. Spolupráce s partnery projektu v oblasti integrace chemických metod a sond do EREM.

**Ing. Eva Tihlaříková, vědecký pracovník - junior (2017-2022)**, je člen výzkumné skupiny EEM na ÚPT AVČR. Odbornice na Monte Carlo simulace a související tematiky. Má bohaté zkušenosti s testováním detektorů a vývojem speciálních účelových aplikací. Je spoluautorkou nové metody studia živých organismů v EREM a autorka dvou článků s impakt faktorem na téma EREM a několika článků bez IF. Aktivně se podílela na řešení řady projektů výzkumu a vývoje a byla členkou řešitelského týmu projektů GAČR, MŠMT a MPO. V rámci cíle 1 spolu-zodpovědná za simulace interakcí elektronového svazku s plynem kapalinou a pevnou látkou. Vytvoření programového kódu pro Monte Carlo simulace elektronového svazku s vodou a částečně i pevnou látkou v EREM. Výzkumně vývojové modifikace programu Geant, spolupráce při výzkumu a vývoji nových detektorů, integrace nových technik do EREM.

**Nový vědecký pracovník - junior bude nominován (2017-2022)**. V rámci cílů 1, 2 a 3 spolu-zodpovědný za simulace radiačního poškození vzorků, simulace teplotního vedení, nové metody a zařízení pro chemickou analýzu vysoce citlivých nativních biologických vzorků. Studium elektrochemických procesů ve vodě po dopadu elektronového svazku. Zkoumání

fázových přechodů při působení různých fyzikálních a chemických vlivů in-situ v komoře vzorku a měření pH v EREM, nové metody. Spolupráce při vývoji detektorů pro dynamické in-situ zkoumání polyelektrolytových kapslí a částic, mapování působení chemických látek a dalších faktorů na tyto vzorky.

**Ing. Jiří Hudec, vědecký pracovník - junior (2017-2022)**, je člen výzkumné skupiny EEM na ÚPT AVČR. V současné době je Ph.D. studentem na FEKT VUT v Brně. Spoluautor dvou článků s impakt faktorem na téma detekce a několika článků bez IF. Byl členem výzkumných a řešitelských týmu ÚPT AVČR projektu GAČR a dvou projektů MŠMT. V rámci cílů 2 a 4 spolu-zodpovědný za výzkumu a vývoji nových vysoce citlivých detektorů a jejich integrace do EREM. Specializace na STEM a Wet-STEM detektor. Experimentální ověřování výsledků MC simulací v EREM. Dynamické in-situ experimenty zaměřené na morfologickou charakterizaci polymerů a optické i mechanické mikromanipulace. Spolupráce při charakterizaci a optimalizaci podmínek pro polymery v komoře EREM. Příprava biologických a polymerních vzorků pro REM a EREM.

**RNDr. Jiří Runštuk, vědecký pracovník junior (2017-2022)**, je člen výzkumné skupiny EEM na ÚPT AVČR, dlouhodobě (od r. 1983) pracuje v oblasti elektronové mikroskopie. Navrhl a realizoval několik konstrukčních řešení diferenciálně čerpaných systémů, řadu úprav a vylepšení. Navrhl a realizoval ionizační detektor pro environmentální mikroskop, podílí se na dalším vývoji a úpravách. Podílel se na vývoji chlazeného (Peltierova) držáku pro větší rozsah teplot. Zabývá se možnostmi sledování obtížně (v REM) pozorovatelných vzorků a dynamickými experimenty v EREM. V rámci cílů 2 a 3 a 4 (50%) spolu-zodpovědný za realizace speciálních a dynamických in-situ experimentů v EREM zejména studium ledu. Spolupráce při vývoji veškeré elektroniky, konstrukci nových detektorů a integraci nových metod a zařízení. Servis mikroskopů a jejich kalibrace.

**Pavel Vitámvás, pracovník - technik (2017-2022)**, je člen výzkumné skupiny EEM na ÚPT AVČR. Čtrnáctiletá praxe v oboru elektro a čtyřletá praxe ve strojařském oboru. Autor vícekanalového ionizačního zesilovače po stránce elektro i softwaru pro řídicí jednotku. Zkušenosti s programy CAD, Eagle (elektro) a Solidworks (strojařská část práce). Podílel se na realizaci několika speciálních detekčních systémů pro EREM, například detektor v rovině vzorku. Spoluúčast na vývoji nového chlazeného (Peltierova) držáku pro větší rozsah teplot. Vývoj a integrace vylepšeného kamerového systému pro pozorování vzorků a mikromanipulací v mikroskopu QUANTA a AQUASEM II. V rámci cílů 2 a 4 bude spolu-zodpovědný za vývoj veškeré elektroniky, návrh desek plošných spojů, výroba, osazení, oživení a implementace do systému. Návrh elektronických obvodů. Tvorba výkresové dokumentace, řízení výroby komponent, implementace do sestav. Servis mikroskopů a jejich kalibrace. Spolupráce při integraci nových mikroskopických metod a chemických senzorů do EREM.

**Nový pracovník - technik bude nominován (2017-2022)**. V rámci cíle 2 a 4 spolu-zodpovědný za vývoj veškeré elektroniky, návrh desek plošných spojů, výroba, osazení, oživení a implementace do systému. Návrh elektronických obvodů. Tvorba výkresové dokumentace, řízení výroby komponent, implementace do sestav. Servis mikroskopů a jejich kalibrace. Spolupráce při integraci nových mikroskopických metod a chemických senzorů do EREM.

**Nový pracovník - technik bude nominován (2017-2022)**. V rámci cíle 2 a 4 spolu-zodpovědný za vývoj veškeré elektroniky, návrh desek plošných spojů, výroba, osazení, oživení a implementace do systému. Návrh elektronických obvodů. Tvorba výkresové dokumentace, řízení výroby komponent, implementace do sestav. Servis mikroskopů a jejich kalibrace. Spolupráce při integraci nových mikroskopických metod a chemických senzorů do EREM.

**Table 5.3.1: Výzkumný tým výzkumného programu 3.** Viz text kapitoly 5.3.5 pro detailnější popis role jednotlivých pracovníků.

Jméno a příjmení	Pozice pracovníka	Role v týmu, příslušnost k výzkumné aktivitě	H-index	1. rok	2. rok	3. rok	4. rok	5. rok	6. rok
				FTE v době realizace projektu					
Vilém Neděla	Klíčový pracovník	Vedoucí VP3, vedoucí cíl 2, vedoucí aktivita 1 cíl 3	5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Peter Gemeiner	Excelentní pracovník	Člen VP3, supervize - vedoucí cíl 3, vedoucí aktivita 3 cíl 3	29	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Marek Bučko	Klíčový pracovník	Člen VP3, vedoucí aktivita 3 cíl 3	11	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Jaroslav Katrlík	Pracovník - Senior	Člen VP 3, člen aktivita 3 cíl 3	14	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Dominik Heger	Klíčový pracovník	Člen VP 3, vedoucí aktivita 2 cíl 3	14	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Jan Ježek	Pracovník - Senior	Člen VP 3, vedoucí cíl 4	8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ivo Konvalina	Pracovník - Junior	Člen VP 3, Cíl 1	5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Martin Oral	Pracovník - Senior	Člen VP 3, vedoucí cíl 1	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eva Navrátilová	Pracovník - Junior	Člen VP 3, Cíl 1, 4	0		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Jiří Maxa	Pracovník - Junior	Člen VP 3, Cíl 1, 3	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Eva Tihlaříková	Pracovník - Junior	Člen VP 3, Cíl 1	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Jiří Hudec	Pracovník - Junior	Člen VP 3, Cíl 2, 4	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bude nominován	Pracovník - Junior	Člen VP 3, Cíl 1, 2, 3		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Jiří Runštuk	Pracovník - Junior	Člen VP 3, Cíl 2, 3, 4	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Pavel Vitámvás	Technický pracovník	Člen VP 3, Cíl 2, 4	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bude nominován	Technický pracovník	Člen VP 3, Cíl 2, 4	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bude nominován	Technický pracovník	Člen VP 3, Cíl 2, 4	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0



## Výsledky klíčových a excelentních členů odborného týmu dosažené v letech 2011-2015

### Ing. Peter Gemeiner, DrSc., excelentní vědecký pracovník

5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:

1. M. Bučko, A. Schenk Mayerová, P. Gemeiner, A. Vikartovská, M.D. Mihovilovič, I. Lacík: Continuous testing system for Baeyer-Villiger biooxidation using recombinant *Escherichia coli* expressing cyclohexanone monooxygenase encapsulated in polyelectrolyte complex capsules. *Enzyme & Microbial. Technology*. 49, 284-288, 2011. IF: 2,367. Počet citací bez autocitací: 14
2. M. Bučko, D. Mislovičová, J. Nahálka, A. Vikartovská, J. Šefčovicová, J. Katrlík, J. Tkáč, P. Gemeiner, I. Lacík, V. Štefuca, M., Polakovič, M. Rosenberg, M. Rebroš, D. Šmogrovičová, J. Švitel: Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro- to nanoscale systems. *Chemical Papers*, 66, 983-998, 2012. IF: 0,879. Počet citací bez autocitací: 17
3. A. Schenk Mayerová, M. Bučko, P. Gemeiner, D. Chorvát, I. Lacík: Viability of free and encapsulated *Escherichia coli* overexpressing cyclopentanone monooxygenase monitored during model Baeyer-Villiger biooxidation by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Letters* 34, 309-314, 2012. IF: 1,583. Počet citací bez autocitací: 7
4. A. Schenk Mayerová, M. Bučko, P. Gemeiner, D. Trelová, I. Lacík, D. Chorvát, Jr, P. Ačai, M. Polakovič, M. Rebroš, M. Rosenberg, V. Štefuca, V. Nedela, E. Tihlárková: Immobilisation of a whole-cell biocatalyst overexpressing Baeyer-Villiger monooxygenase: Physical and biocatalytic properties of polyvinyl alcohol lens-shaped particles versus spherical polyelectrolyte complex microcapsules. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 174, 1834-1849, 2014. IF: 1,735. Počet citací bez autocitací: 2
5. M. Šunderić; A. Šedivá, D. Robajac, G. Miljuš, P. Gemeiner, O. Nedić, J. Katrlík: Lectin-based protein microarray analysis of differences in serum alpha-2-macroglobulin glycosylation between patients with colorectal-cancer and persons without cancer. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2016, DOI: 10.1002/bab.1407, in press. IF: 1,429. Počet citací bez autocitací: 1

5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel):

1. Projekt SF EÚ OPVV Projekty Strukturálních fondů EÚ, Operační program Věda a výzkum „Aplikovaný výzkum v oblasti průmyslové biokatalýzy“ (2012-2014): CHÚ SAV 439 094 EUR (celkově 1 153 663,99 EUR), pozice: spoluřešitel
2. Projekt SF EÚ OPVV Projekty Strukturálních fondů EÚ, Operační program Věda a výzkum „Centrum pro materiály vrstvy a systémy pro plikace a chemické procesy v extrémních podmínkách“ akronym MACHYNA (2009-2011): Ich SAS 69 323,45 EUR (celkově 1 327 735,83 EUR), pozice: spolupříjemce
3. Vědecká grantová agentura SAV a Ministerstva školství a vědy SR VEGA 1/0229/12 „Nové, výkonnější imobilizační technologie pro biokatalyzátory oxidačně-redukčních reakcí a konstrukci biosenzorů a biobaterií“ (2012-2015): CHÚ SAV - 54 960 EUR, pozice: spoluřešitel

4. Vědecká grantová agentúra SAV a Ministerstva školství a vědy SR VEGA 2/0127/10 „Dešifrování glykokódu s využitím lektinomických nástrojů: Imobilizace lektinů v nanoměřítku s detekcí glykoforem v microarray formátě“ (2010-2013): CHÚ SAV - 49 102 EUR + kapitálové výdaje 5023 EUR, pozice: spoluřešitel

5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:

1. V období posledních pěti let byl realizovaný společný projekt se soukromou společností Axxence s.r.o. Bratislava.

#### **Ing. Marek Bučko, Ph.D., klíčový vědecký pracovník**

5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:

1. M. Bučko, A. Schenk Mayerová, P. Gemeiner, A. Vikartovská, M.D. Mihovilovič, I. Lacík: Continuous testing system for Baeyer-Villiger biooxidation using recombinant *Escherichia coli* expressing cyclohexanone monooxygenase encapsulated in polyelectrolyte complex capsules. *Enzyme & Microbial. Technology*. 49, 284-288, 2011. IF:2,367. Počet citací bez autocitací: 14
2. M. Bučko, D. Mislovičová, J. Nahálka, A. Vikartovská, J. Šefčovicová, J. Katrlík, J. Tkáč, P. Gemeiner, I. Lacík, V. Štefuca, M., Polakovič, M. Rosenberg, M. Rebroš, D. Šmogrovičová, J. Švitel: Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro- to nanoscale systems. *Chemical Papers*, 66, 983-998, 2012. IF: 0,879. Počet citací bez autocitací: 17
3. A. Schenk Mayerová, M. Bučko, P. Gemeiner, D. Chorvát, I. Lacík: Viability of free and encapsulated *Escherichia coli* overexpressing cyclopentanone monooxygenase monitored during model Baeyer-Villiger biooxidation by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Letters* 34, 309-314, 2012. IF: 1,583. Počet citací bez autocitací: 7
4. A. Schenk Mayerová, M. Bučko, P. Gemeiner, D. Trelová, I. Lacík, D. Chorvát, Jr, P. Ačai, M. Polakovič, M. Rebroš, M. Rosenberg, V. Štefuca, V. Nedela, E. Tihlárková: Immobilisation of a whole-cell biocatalyst overexpressing Baeyer-Villiger monooxygenase: Physical and biocatalytic properties of polyvinyl alcohol lens-shaped particles versus spherical polyelectrolyte complex microcapsules. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 174, 1834-1849, 2014. IF: 1,735. Počet citací bez autocitací: 2
5. A. Schenk Mayerová, M. Bučko, P. Gemeiner, Katrlík, J. Microbial monooxygenase amperometric biosensor for monitoring of Baeyer-Villiger biotransformation. *Biosensors & Bioelectronics* 50, 235-238, 2013. IF: 6,451. Počet citací bez autocitací: 1

5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel):

1. Agentura pro vědu a výzkum APVV-0302-10 „Imobilizační techniky pro přípravu biokatalyzátorů na průmyslovou produkci přírodních aromat“ (2011-2014): CHÚ SAV 65 000 EUR (celkově 249 968 EUR), pozice: Hlavní řešitel.
2. Agentura pro vědu a výzkum APVV-15-0227 APVV-15-0227 “Imobilizačně rekombinační mikroorganismy pro biotechnologickou produkci chemických specialit pomocí

biokatalytických kaskádových reakcií” (2016-2020), celkovo 249 509 EUR, pozice: Hlavní řešitel.

3. Vědecká grantová agentura SAV a Ministerstva školství a vědy SR VEGA 2/0090/16 „Vývoj nových imobilizačních katalistů s použitím rekombinantních mikroorganismů pro kaskádové biokatalytické reakce” (2016-2019): ICh SAS 54 740 EUR, pozice: Hlavní řešitel

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

1. V období posledních pěti let byl realizovaný společný projekt se soukromou společností Axxence s.r.o. Bratislava

### **Mgr. Dominik Heger, Ph.D., klíčový vědecký pracovník**

*5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. Solomek, T.; Heger, D.; Ngoy, B. P.; Givens, R. S.; Klan, P., The Pivotal Role of Oxyallyl Diradicals in Photo-Favorskii Rearrangements: Transient Spectroscopic and Computational Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 15209-15215. IF: 11.444. Počet citací bez autocitací: 8
2. Krausko, J.; Runštuk, J.; Neděla, V.; Klán, P.; Heger, D., Observation of a Brine Layer on an Ice Surface with an Environmental Scanning Electron Microscope at Higher Pressures and Temperatures. *Langmuir* 2014, 30, 5441-5447. IF: 4.457, Počet citací bez autocitací: 3
3. Bartels-Rausch, T.; Jacobi, H. W.; Kahan, T. F.; Thomas, J. L.; Thomson, E. S.; Abbatt, J. P. D.; Ammann, M.; Blackford, J. R.; Bluhm, H.; Boxe, C.; Domine, F.; Frey, M. M.; Gladich, I.; Guzmán, M. I.; Heger, D.; Huthwelker, T.; Klán, P.; Kuhs, W. F.; Kuo, M. H.; Maus, S.; Moussa, S. G.; McNeill, V. F.; Newberg, J. T.; Pettersson, J. B. C.; Roeselová, M.; Sodeau, J. R., A review of air-ice chemical and physical interactions (AICI): liquids, quasi-liquids, and solids in snow. *Atmos. Chem. Phys.* 2014, 14, 1587-1633. IF: 5.053. Počet citací bez autocitací: 26
4. McNeill, V. F.; Grannas, A. M.; Abbatt, J. P. D.; Ammann, M.; Ariya, P.; Bartels-Rausch, T.; Domine, F.; Donaldson, D. J.; Guzman, M. I.; Heger, D.; Kahan, T. F.; Klán, P.; Masclin, S.; Toubin, C.; Voisin, D., Organics in environmental ices: sources, chemistry, and impacts. *Atmos. Chem. Phys.* 2012, 12, 9653-9678. IF: 5.510. Počet citací bez autocitací: 33
5. Heger, D.; Nachtigallova, D.; Surman, F.; Krausko, J.; Magyarova, B.; Brumovsky, M.; Rubes, M.; Gladich, I.; Klan, P., Self-Organization of 1-Methylnaphthalene on the Surface of Artificial Snow Grains: A Combined Experimental-Computational Approach. *Journal of Physical Chemistry A* 2011, 115, 11412-11422. IF: 2.946. Počet citací bez autocitací: 16

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel):*

1. Grantová agentura České republiky Projekt GAČR: GP203/09/P445 Luminiscenční a elektrochemická studie látek v ledu, (2009-2011) Objem získaných prostředků: 55 000 Euro. Hlavní řešitel.

2. Smlouva o spolupráci, University of Cambridge, (2015), Objem získaných prostředků: 6 000 Euro.

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

1. Heger, D.; Krausková, L., Patent pending, Czech priority application 2015, PV 2015-55. Patent čeká na udělení, a tedy doposud nedošlo ke komercializaci.
2. Proof of Concept. Technologie pro odečet pH z digitálního záznamu papírových indikátorů. (CZ.1.05/3.1.00/10.0216). Spolupráce s Pliva Lachema.

**Ing. et Ing. Vilém Neděla, Ph.D., klíčový vedoucí vědecký pracovník**

*5 nejvýznamnějších výzkumných publikací vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením citovanosti:*

1. Neděla, V; Tihlaříková, E; Hřib, J. The Low-Temperature Method for Study of Coniferous Tissues in the Environmental Scanning Electron Microscope. Microscopy Research Technique 2015, 78, No. 1, 13-21. IF: 1,130. Počet citací bez autocitací: 1
2. Neděla, V; Hřib, J.; Vooková, B. Imaging of early conifer embryogenic tissues with the environmental scanning electron microscope. Biologia Plantarum, 2012, 56, No. 3, 595-598. IF: 1,692. Počet citací bez autocitací: 1
3. Krejčí, J.; Sajdllová, Z.; Neděla, V; Flodrová, E; Šejnohová, R.; Vránová, H. Plička, R. Effective Surface Area of Electrochemical Sensors. Journal of the Electrochemical Society. 2014, 161, No. 6, b147-b150. IF: 3,266. Počet citací bez autocitací: 1
4. Krausko, J.; Runštuk, Jiří; Neděla, Vilém Klán, P.; Heger, D. Observation of a Brine Layer on an Ice Surface with an Environmental Scanning Electron Microscope at Higher Pressures and Temperatures. Langmuir. 2014, 30, No. 19, 5441-5447. IF: 4,457. Počet citací bez autocitací: 3
5. Schenk Mayerová, A.; Bučko, M.; Gemeiner, P. ; Trešlová, D. ; Lacík, I. ; Chorvát Jr., D. ; Ačai, P. ; Polakovič, M. ; Lipták, L. ; Rebroš, M. ; Rosenberg, M. ; Štefuca, V. ; Neděla, Vilém ; Tihlaříková, Eva. Physical and Bioengineering Properties of Polyvinyl Alcohol Lens-Shaped Particles Versus Spherical Polyelectrolyte Complex Microcapsules as Immobilisation Matrices for a Whole-Cell Baeyer-Villiger Monooxygenase. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2014, roč. 174, č. 5, s. 1834-1849. ISSN 0273-2289. IF: 1,735. Počet citací bez autocitací: 2

*5 nejvýznamnějších výsledků v oblasti získávání grantových prostředků vztahujících se k výzkumné agendě projektu s vyznačením objemu získaných prostředků (jen hlavní řešitel či spoluřešitel):*

1. Grantová agentura České republiky GAP102/10/1410 Studium vlivu magnetického a elektrostatického pole na zesílení signálu sekundárních elektronů detekovaných novým detektorem pro VP-SEM (2010-2013). Objem získaných prostředků: 375 tis Kč.
2. Grantová agentura České republiky GA ČR GA14-22777S Studium interakcí elektronů s plynem v podmínkách tlakového spádu nízkoenergieového environmentálního rastrovacího elektronového mikroskopu (2014-2016). Objem získaných prostředků 7 744 tis Kč:
3. Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy MŠMT CZ.1.07/2.3.00/20.0103 Podpora lidských zdrojů a transferu znalostí v podmínkách mezinárodní spolupráce vědeckých týmů (2011-2014). Objem získaných prostředků: 25 180 tis Kč.

4. Ministerstvo průmyslu a obchodu MPO FR-TI1/118 Nová generace elektrochemických senzorů a biosenzorů s využitím tenkých modifikovaných DLC vrstev (2009-2013). Objem získaných prostředků: 8 026 tis Kč.
5. Ministerstvo průmyslu a obchodu MPO FR-TI1/305 Aplikace laserových technologií do procesu výroby krystalických křemíkových solárních článků (2009-2013). Objem získaných prostředků: 2 830 tis Kč.

*5 nejdůležitějších výsledků v oblasti patentů a spolupráce s průmyslem ve vztahu k výzkumné agendě projektu:*

1. Neděla, V.; Jiráček, J. Patent číslo: EP2195822, Ionizační detektor pro environmentální elektronovou mikroskopii. 2011.
2. Fořt, T; Sobota, J; Neděla, V; Dupák, L; Kapounek, P; Dupák, J. Prototyp nové naprašovací aparatury pro depozici B-DLC vrstev. 2012.
3. Sobota, Jaroslav; Kučerová, R.; Neděla, Vilém; Rek, Antonín; Krejčí, J. Funkční vzorek senzoru s deponovanou tlustou vrstvou C. 2012.
4. Fořt, T; Dupák, L; Sobota, J; Neděla, V; Kapounek, P; Dupák, J; Krejčí, J. Prototyp repliky původní naprašovací aparatury s vylepšenou funkčností pro depozici B-DLC vrstev. 2013.
5. Fořt, T; Kučerová, R.; Neděla, V; Krejčí, J. Funkční vzorek elektrochemických senzorů s deponovanou B-DLC vrstvou tlustou 885nm a obsahem boru 24hmotnostních procent boru. 2013.

### 5.3.6. Charakteristika pořizovaného klíčového vybavení/funkčních modulů

V následujících tabulkách jsou uvedeny požadované klíčové vybavení a funkční moduly, jejich pořizovací náklady a technická specifikace. Jednotlivě jsou uvedeny přístroje, zařízení a software nezbytné pro realizaci projektu ve vazbě na VP3. Jmenovitě jsou uvedeny všechny položky s pořizovací cenou 1 mil Kč (bez DPH) a vyšší. Položky s nižší hodnotou jsou sdruženy do funkčních modulů, dle jejich povahy a provázanosti s konkrétní výzkumnou aktivitou VP3, ale též VP1 a VP2.

Požadované investice jsou též popsány podrobně v rozpočtu (příloha 8 a povinná příloha v systému MS2014+.), komentáři k rozpočtu (příloha 9) a jejich ceny podloženy soupisem jednotlivých cenových nabídek (příloha 10).

<b>Klíčové vybavení / funkční modul (seřadte dle ceny sestupně od nejvyšší)</b>	<b>Počet kusů položky</b>	<b>Plánovaná cena celkem bez DPH (tis. Kč)</b>
1. Konfokální laserový rastrovací mikroskop	1	11 983
<p><u>Charakteristické vlastnosti:</u> Konfokální laserový rastrovací mikroskop s širokými možnostmi dalšího rozšíření zahrnující speciální filtry, možnost připojení laserů různých vlnových délek a dalších komponent. Specifikace je uvedena v cenové nabídce (příloha 10). Kapitola 6.2 dále popisuje potřebnost a využití pořizovaného vybavení.</p> <p><u>Účel pořizovaného vybavení:</u></p>		

Konfokální laserový mikroskop bude pořízen za účelem realizace korelativní mikroskopie mezi zařízeními EREM, konfokálním fluorescenčním mikroskopem a Ramanovským spektroskopem s následným rozšířením aplikačních možností těchto metod. Nový fluorescenční mikroskop bude umístěn v bezprostřední blízkosti EREM, což je nezbytné pro precizní korelativní mikroskopii vysoce citlivých vzorků. EREM je již vybaven SW pro korelativní mikroskopii poskytující potřebné rozhraní pro synchronizaci jednotlivých mikroskopů. Takto vybavený soubor přístrojů bude využit především při řešení výzkumného cíle 4 tohoto výzkumného programu se zapojením všech dalších partnerů (obr. 5.3.4).

Připravenost infrastruktury:

Infrastruktura ÚPT AVČR je připravena bez nutnosti dalších nákladů. ÚPT AVČR disponuje stavebně přizpůsobenou budovou laboratoří elektronové mikroskopie s potřebným prostorem pro optický fluorescenční mikroskop, jak uvedeno v kap. 6.1.

2. Funkční modul - optické komponenty pro integraci optických a laserových technik do EREM	1	3 496
--	---	-------

Charakteristické vlastnosti:

Sestava 9 nezávislých optických komponentů nezbytných pro vývoj, realizaci a další integraci konfokálního laserového mikroskopu, Ramanova spektrometru a laserových mikromanipulátorů do EREM QUANTA 650 FEG. Podrobný seznam komponentů je uveden v kapitole 6.2. a v příloze 10.

Účel pořizovaného vybavení:

Účelem pořízené sestavy bude výzkum, vývoj a realizace speciálního funkčního celku optických systémů určených pro integraci do komory vzorku EREM. Jedná se o speciální zákaznické řešení umožňující kombinaci metod optické i elektronové mikroskopie a dalších analytických metod pro zkoumání biologických a polymerních vzorků bez nutnosti transportu vzorků, vše při definované poloze a v definovaném prostředí. Výhodou tohoto řešení bude možnost současného zobrazení i analýz všemi po integraci v EREM dostupnými metodami a vysoce přesná korelativní mikroskopie. Takto vybavený soubor přístrojů bude využit především při řešení výzkumného cíle 4 tohoto výzkumného programu se zapojením všech dalších partnerů (obr. 5.3.4).

Připravenost infrastruktury:

Infrastruktura je zcela připravena bez nutnosti dalších nákladů.

3. Funkční modul - software a PC pro simulace proudění plynu a přestupu tepla v EREM a doplňkový software k X-Ray EDS analyzátoru EREM QUANTA 650 FEG	1	3 058
---	---	-------

Charakteristické vlastnosti:

Systém řešící metodou konečných objemů mechaniku kontinua přesným popisem spojitosti odvozením od sil, které působí na jednotlivé části tekutiny: gravitace, tlak, tření o sousední části tekutiny, vznik turbulence. Stav tekutiny je popsán její rychlostí a tlaky ve všech bodech, ve kterých se tekutina nachází. Podrobný popis je uveden v kapitole 6.2.

Účel pořizovaného vybavení:

Analýzy proudění plynu v komorách environmentálního elektronového mikroskopu a přestupu tepla v oblasti vzorku pro stanovení vhodné tvarové konstrukce vyvíjeného zařízení ještě v etapě návrhu. Ušetří finance i čas při vývoji nových zařízení. Experimentální měření by mělo již jen ověřit správnost volby. Umožní také získat informace o chování plynu z míst

experimentálně nedostupných. Zakoupení softwaru umožní plné využití možností existujícího EDS X-Ray analyzátoru v mikroskopu QUANTA 650 FEG a další rozšíření těchto možností pro prvkovou charakterizaci nativních biologických a polymerních vzorků v prostředí vysokého tlaku plynů EREM. Účel softwaru je podrobněji popsán v rámci kapitoly 6.2 a bude využit při řešení aktivit všech výzkumných cílů tohoto programu.

#### Připravenost infrastruktury:

Software pro simulace proudění plynu a přestupu tepla v EREM bude instalován do serveru, který bude součástí dodávky. Server bude umístěn v připravené místnosti společně s ostatními výpočetními stanicemi ÚPT AVČR. Infrastruktura je zcela připravena bez nutnosti dalších nákladů. Infrastruktura pro nákup doplňkového softwaru k X-Ray analyzátoru EREM QUANTA 650 FEG je zcela připravena bez nutnosti dalších nákladů.

### 5.3.7. Vazba výzkumného programu na rozpočet projektu

Rozpočet pro tento výzkumný program je uveden v příloze 8 a komentář tohoto rozpočtu v příloze 9. Tvoří též součást povinných příloh vložených do aplikace do systému MS2014+.

## 6. VYUŽITÍ INFRASTRUKTURY

### 6.1. Využití existující infrastruktury

Navrhované centrum excelentního výzkumu je multidisciplinární, sdružující pohled biologický, fyzikálně-chemický a technologický na zobrazování a analýzu dynamiky buněčných dějů v rostlinných a živočišných modelech. Infrastruktura a přístrojové vybavení navrhovatelského VaV centra pokročilé mikroskopické analýzy rostlinných buněk ÚEB AVČR jsou dlouhodobě budovány s cílem studovat děje v rostlinných buňkách pomocí kombinace molekulárně-biologických a mikroskopických přístupů (kapitola 3.3). S ohledem na mikroskopické přístupy je VaV centrum ÚEB špičkově vybaveno v oblasti fluorescenční mikroskopie, s hlavním akcentem na *in vivo* přístupy. Navrhovaný projekt však umožní rozvinout výzkum i směrem k využití infrastruktury a vybavení zapojených partnerů projektu, tj. VaV SUPRAMOL ÚMCH AVČR, ZRIR IKEM a ÚPT AVČR. Hlavním smyslem zapojení partnerů však je vytvoření multidisciplinárního celku přinášející kvalitativní posun do oblasti mikroskopického studia buněk prostřednictvím vývoje nových technologií a postupů při detekci buněčných struktur. Tyto zahrnují nové nanočásticové systémy (SUPRAMOL ÚMCH), nové postupy kryofixace buněčného materiálu (ZRIR IKEM) a nové detektory pro neinvazivní elektronovou mikroskopii (EEM ÚPT AVČR). Jako přidanou hodnotu obsahuje projekt ve všech třech výzkumných projektech řadu využití mikroskopických postupů pro cílenou přípravu a následnou detekci nanočástic využívaných v medicíně a zemědělství. Propojení infrastruktur navrhovatele a partnerů pro řešení navrhovaného projektu tak skýtá i možnost řady aplikačních výstupů.

Následující text uvádí přehled stávajícího vybavení jednotlivých infrastruktur. Nejpodrobněji je text pojednán u partnera EEM ÚPT AVČR, výsledkem jehož zapojení je přímo rozvíjení technických parametrů zapojené infrastruktury.

Infrastruktura navrhovatelského **VaV centra ÚEB AVČR pokročilé mikroskopické analýzy rostlinných buněk** je začleněna do struktury laboratoří a společných pracovišť ÚEB AVČR

(příloha 2), které jsou vybaveny veškerým zázemím pro moderní molekulárně biologicky orientovaný výzkum v oblasti experimentální biologie rostlin. S ohledem na navrhovaný projekt bude využito zejména infrastrukturního vybavení pracoviště zobrazovací jednotky (<http://www.ueb.cas.cz/if>). Ve všech aktivitách VP 1 a návazných aktivitách (Obr. 5.1.1) budou, vedle veškerého zázemí pro molekulární biologii, využity laserové konfokální mikroskopy Zeiss LSM 5 Duo a Zeiss LSM 880 se spektrální detekcí, konfokální mikroskop na principu rotujícího Nipkowova kotouče Nikon Eclipse Ti-E, Yokogawa CSU-X1 (spinning disk), mikroskop se strukturovaným osvitom Zeiss Apotome 2 a automatizovaná stanice pro imunohistochemické metody. V roce 2018 bude podstatně vylepšeno prostorové rozlišení Zeiss LSM 880 instalací jednotky AiryScan v rámci OPVVV projektu "Výzkumné infrastruktury pro vzdělávací účely - budování či modernizace" (reg. Č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001775; 2017-2020).

**VaV centrum partnerského pracoviště SUPRAMOL ÚMCH AVČR** bude v projektu využívat především v rámci VP 2 existující vybavení ÚMCH AVČR. Pro projekt bude zejména důležité využití statického, dynamického a elektroforetického rozptylu světla, syntetické a radiochemické laboratoře, analytického servisu, rozptylu rentgenového záření, nukleární magnetické rezonance, UV-VIS spektroskopie, mikroskopie atomárních sil a rentgenové fluorescence. Veškeré další vybavení ÚMCH AVČR bude k dispozici v případě potřeby bez dodatečných plateb, též pro aktivity v VP1 a VP 3 (Obr. 5.2.1).

**VaV centrum partnerského pracoviště IKEM (ZRIR)** disponuje mikroskopickou infrastrukturou, která bude k dispozici pro předkládaný projekt, přednostně pro aktivity VP 2, se všemi přesahy k VP 1 a VP 3 (Obr. 5.2.1). Především v rámci aktivity 6 výzkumného cíle 1 VP 2 bude k testování nových nanočástic využíván celotělový MR tomograf 3 T určený převážně ke klinickému výzkumu v MR spektroskopii a zobrazování umožňující pracovat s  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  jádru a zobrazovat malá zvířata, experimentální 4,7 T MR tomograf, dva relaxometry (velikost pole je 0,5 T a 1 T), optické mikroskopy a fluorescenční optické zařízení pro zobrazování malých zvířat.

**VaV partnerského centra EEM ÚPT AV ČR** disponuje technickým i softwarovým vybavením, které bude v rámci projektu využito. Zázemí ÚPT AVČR využitelné v projektu zahrnuje dílny mechanického zpracování, moderní CNC obráběcí stroje, laboratoře laserového svařování, dílny obloukového svařování, napařovací a naprašovací aparatury pro výrobu přesných sub-nanometrových tenkých vrstev, elektronovou svářečku, diagnostická zařízení magnetické rezonance, radioelektronickou laboratoř pro zpracování signálů až do 10 GHz, laboratoř digitálního zpracování signálů, atd. Tato pracoviště umožní realizaci unikátních komponentů i větších celků pro speciální přístroje vyvíjené v rámci projektu.

Oblast elektronové mikroskopie je zastoupena pěti rastrovacími (REM) elektronovými mikroskopy a dvěma environmentálními rastrovacími elektronovými mikroskopy (EREM) (Obr. 6.1 a 6.2) a laboratořemi pro přípravu vzorků. Dva z těchto mikroskopů (FEI QUANTA FEG 650 a nekomerční experimentální mikroskop EREM AQUASEM II) jsou součástí specializované laboratoře environmentální elektronové mikroskopie, která je spravována přímo členy řešitelského týmu partnera projektu. Další laboratoře jsou vybaveny mikroskopy REM VEGA od firmy Tescan, HR-REM Jeol 6700F od firmy Jeol a UHR-REM MAGELLAN 400 od firmy FEI. Většina mikroskopů je také vybavena sofistikovanými detektory EDS, EBSD a katodoluminiscence pro materiálovou analýzu.

Výše uvedené laboratoře a mikroskopy zde umístěné jsou speciálně uzpůsobeny pro vývoj a testování detektorů a budou v rámci předkládaného projektu použity na experimentální



měření na základě výsledků MC simulací (VP 3, výzkumný cíl 1), optimalizaci nových vysoce citlivých detektorů a detekčních principů v EREM (VP 3, výzkumný cíl 2), k ověřování nových metod pro charakterizaci vysoce citlivých vzorků, dynamické in situ experimenty, korelativní mikroskopii (VP 3, výzkumný cíl 3) a v konečné fázi integraci nových systémů a metod do mikroskopu (VP 4, výzkumný cíl 4).



**Obr. 6.1:** Nový environmentální rastrovací elektronový mikroskop QUANTA 650 FEG vybavený mikromanipulátory a dalšími unikátními systémy (vlevo) a experimentální rastrovací elektronový mikroskop AQUASEM II, přestavěný týmem EEM na ÚPT AVČR v Brně (vpravo).



**Obr. 6.2:** Vysokorozlišovací rastrovací elektronový mikroskop Jeol JSM-6700 (vlevo), rutinní rastrovací elektronový mikroskop Vega od firmy Tescan s termoemísí katodou (uprostřed) a vysokorozlišovací rastrovací elektronový mikroskop MAGELLAN 400 od firmy FEI v ÚPT AVČR v Brně.

V rámci VaV centra EEM je také zahrnuta část skupiny Elektronové optiky ÚPT AVČR, která se zabývá studiem elektronově optických prvků a soustav z teoretického i praktického hlediska. Disponuje vlastními výkonnými programy pro výpočet elektromagnetických polí a jejich optických vlastností (Geant a EOD), s rozhraním vyvinutým ve spolupráci s TU Delft, a programy z University Manchester, pro konstrukční návrhy pak používá systém CAD. Díky odborné specializaci jednotlivých členů (např. částicová optika, vakuová fyzika, jemná mechanika) je v možnostech skupiny provést teoretický i konstrukční návrh včetně experimentální realizace. Dále se skupina zaměřuje na rozvoj metod modelování elektronově optických vlastností. Zmíněný software bude použit v rámci předkládaného projektu pro simulace interakcí elektronového svazku s plynem, kapalinou a pevnou látkou v EREM (VP3, výzkumný cíl 1).

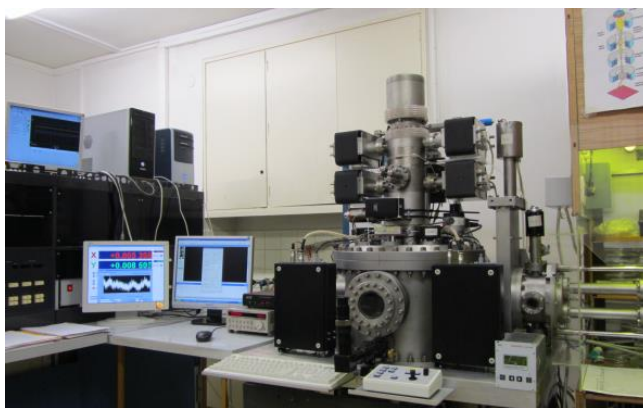
Oddělení Speciálních technologií ÚPT AVČR se zabývá vývojem technologií a konstrukcí technologických zařízení, které představují nezbytné zázemí pro stavbu elektronově optických přístrojů pracujících ve vakuovém prostředí. Mezi tyto technologie patří svařování a mikroobrábění elektronovým svazkem, pájení ve vakuu, vývoj a výroba vakuových průchodků, magnetronové naprašování, charakterizace tenkých vrstev a vytváření povlaků. V rámci oddělení Speciálních technologií jsou k dispozici modernizovaná vakuová vertikální pec válcového tvaru Tesla PZ 810 umožňující pájení stříbrem, mědí nebo niklovou pájkou a

žihání ve vakuu a malá laboratorní vakuová pec vhodná pro pájení a tepelné zpracování menších součástek (Obr. 6.3). Pro rutinní přípravu vzorků a běžné prohlížení povrchů je k dispozici optický mikroskop Olympus LEXT OLS3100 (Obr. 6.3). Zkušenosti členů oddělení Speciálních technologií a vybavení, viz zmíněné vakuové pece, budou využity při konstrukci diferenciálně čerpaných komor a detektorů s nově navrženým designem (VP3, výzkumné cíle 1 a 2). Speciální držáky vzorků, pájené vakuové komponenty, příruby i celá řada drobných součástek i větších zařízení bude využita při realizaci VP3, výzkumných cílů 3 a 4.



**Obr. 6.3:** Modernizovaná vakuová vertikální pec válcového tvaru Tesla PZ 810 (vlevo), malá laboratorní vakuová pec vlastní konstrukce (uprostřed) a optické mikroskopy Olympus LEXT OLS3100 (vpravo).

Součástí tohoto oddělení je také oddělení Elektronové litografie ÚPT AVČR, které se zabývá výzkumem technologie mikrolitografie pomocí elektronového litografu (Obr. 6.4). Jeho činnost je zaměřena zejména na velkoplošné mikrostruktury pro difrakční optické elementy pro formování laserového svazku, na submikronmetrové difrakční holografické struktury, na struktury v tenkých vrstvách kovů a dielektrik na křemíkových podložkách pro biosenzory a vodivostní chemické senzory a struktury v laterálním rozlišení pod 100 nanometrů vytvářené rytím pomocí mikroskopu AFM. Oddělení Elektronové litografie vlastní profesionální off-line a on-line software pro řízení expozice, modelování a simulace optimalizace parametrů vytvářených struktur a pro usnadnění jejich návrhu. Elektronový litograf, AFM mikroskop a přidružený software bude v rámci projektu využit při konstrukci nových detektorů a držáků vzorků (VP 3, výzkumný cíl 2) a při výzkumu a vývoji nových metod a chemických senzorů (VP 3, výzkumný cíl 3).



**Obr. 6.4:** Elektronový litograf s tvarovaným svazkem, urychlovacím napětím 15 kV, rozlišením 100 nm.

Oddělení Optické mikromanipulační techniky ÚPT AVČR řeší problematiku týkající se využití mechanických účinků laserového záření při jeho interakci s dielektrickými objekty a vlastní Ramanův spektrometr. Bylo navrženo a realizováno experimentální zařízení (jediné v ČR),

keré umožňuje prostorové uchopení mikroobjektů a nanoobjektů do světelných polí a jejich řízené přemísťování v prostoru. Zařízení je rozšiřováno o možnost generovat několik optických pastí a nezávisle je prostorově polohovat pomocí počítače. Byla navržena originální metoda využívající stojaté gaussovské vlny pro uchopení objektů. Součástí zařízení je také optický skalpel, který využívá absorpce fokusovaného laserového svazku k odpaření velmi malého objemu (cca 1 mikrometr x 1 mikrometr x 1 mikrometr) materiálu na povrchu objektu či uvnitř. Manipulační systém byl obohacen o pulsní laser umožňující provádět laserové mikroablace, čehož je experimentálně využíváno pro změny topologie opticky chycených objektů, perforace vnějších a vnitřních membrán živých organismů a fúzi živých buněk. Zařízení umožňuje optické třídění, využívá k tomu vhodně prostorově rozložené intenzity laserového svazku k třídění mikroobjektů nebo submikrometrových objektů podle velikosti nebo indexu lomu. Díky fotopolymeraci je možné vytváření mikrostruktur fokusovaným laserovým svazkem. Osvícená oblast vytuhne a stává se součástí vytvářené mikrostruktury.

Ramanův spektrometr se plánuje využít k *ex vivo* a *in vivo* řešení biologických otázek a jako podpůrná nedestruktivní technika k elektronovým a optickým mikroskopům ke studiu molekulární struktury biologických vzorků a citlivých polymerů. Dále bude využít pro dynamické in-situ experimenty v módu kombinované elektronové a světelné mikroskopie, Ramanovy spektroskopie (VP 3, výzkumné cíle 3 a 4). Experimentální zařízení pro uchopování objektů do světelných polí bude využíváno v rámci projektu pro práci s biologickými vzorky a polymery (VP 3, výzkumné cíle 3 a 4). Výše uvedené, pro integraci do EREM optimalizované technologie, budou hlavním předmětem VaV aktivit v VP 3, výzkumném cíli 4.

## 6.2. Potřebnost a využití nové infrastruktury a vybavení

V rámci tohoto projektu není plánována žádná stavební aktivita, projekt v maximální možné míře využívá stávající infrastruktury a doplňuje jí jen v oblasti přístrojového vybavení. 3 výzkumné programy navrhovaného centra obsahují ve svém popisu specifikace přístrojového vybavení, jejich charakteristické vlastnosti, účel a připravenost stávající infrastruktury, pro VP 1 v kap. 5.1.6, pro VP 2 v kap. 5.2.6 a pro VP 3 v kap. 5.3.6. Technická a cenová specifikace pro nové přístroje je uvedena v podobě cenových nabídek (příloha 10). Jak je uvedeno v povinné příloze rozpočtu projektu, plánované investice budou realizovány přednostně v roce 2018, jen jedna v roce 2019. Výběrová řízení budou probíhat dle aktuálně platných pravidel.

Následující text shrnuje a uvádí další detaily popisující účelnost pořízení vybavení a zařízení, které ještě nebyly zmíněny v kap. 5.1.6, 5.2.6 a 5.3.6.

**VaV centrum pokročilé mikroskopické analýzy rostlinných buněk ÚEB AVČR** plánuje modernizovat přístrojové vybavení ve třech oblastech.

V roce 2018 bude modernizováno snímání slabých signálů instalací vysoce citlivé EMCCD kamery ke stávajícímu spinning disk mikroskopu, což bude klíčové pro zdárné řešení výzkumného cíle 1, především v aktivitách 1-3 a výzkumného cíle 2 v aktivitě 1. Těž bude modernizováno snímání na stávajícím fluorescenčním stereomikroskopu Nikon SDZ25 instalací CMOS kamery, včetně PC a softwaru (aktivita 2, cíl 2). Dále bude modernizována sestava obrazových analyzátorů, které jsou již ve VaV centru ÚEB zastaralé.

V roce 2018 bude modernizováno a kapacitně posíleno kultivační a molekulárně biologické zázemí VaV centra ÚEB AVČR pořízením 2 inkubačních třepaček, 2 automatizovaných autoklávů a 4 PCR termocyklérů. Tato zařízení budou využita ve všech aktivitách obou výzkumných cílů výzkumného programu 1. U všech těchto přístrojů je účelem nahrazení starých nevyhovujících zařízení a zvýšení kapacity dané náborem nových členů týmů.

V roce 2019 bude modernizováno a kapacitně rozšířeno pracoviště automatizovaného histochemického barvení rostlinného materiálu. Nákupem nové stanice dojde k zpřístupnění nových imunocytochemických metod pro všechny aktivity obou výzkumných cílů VP 1. Též však budou na tomto zařízení cíleně testovány nové protilátky značené nanočásticemi, připravené v rámci řešení VP 2 a připravovány značené vzorky pro elektronovou mikroskopii v rámci řešení VP 3.

**VaV centrum partnerského pracoviště SUPRAMOL ÚMCH AVČR** plánuje modernizovat přístrojové vybavení v pěti oblastech. Pořízení všech přístrojů je nezbytné pro řešení projektu, v řadě případů nahrazují zastaralé, nevyhovující či kapacitně nedostačující stávající přístroje. V roce 2018 bude pořízena sestava zařízení pro syntézu monomerů, polymerů a nanočástic, GPC systém, funkční modul vybavení pro pokročilá zobrazování, GC systém a bodotávek. Účelnost nákupu a způsob doplnění stávající infrastruktury je uveden v kapitole 5.2.6. Veškerá zařízení budou přednostně využita týmy řešící aktivity VP 2.

**VaV centrum partnerského pracoviště IKEM (ZRIR)** plánuje modernizovat přístrojové vybavení ve 4 oblastech. Jak je uvedeno v kap. 6.1, ZRIR IKEM se dlouhodobě zaměřuje na techniku MRI, ale v rámci VP 2 plánuje v aktivitě 6 výzkumného cíle 1 ve spolupráci s partnery testování <sup>19</sup>F MRI kontrastních látek, které umožňují kombinovat MRI zobrazení s elektronovou a fluorescenční mikroskopií. Proto ZRIR IKEM prostřednictvím svého zapojení ve VP2 nominuje do projektu skupinu elektronové mikroskopie pod vedením Prof. Rašky (tab. 5.2.3) a své pracoviště hodlá vybavit přístroji pro přípravu vzorků pro kryoelektronovou mikroskopii a též podpořit modernizaci stávajících elektronových mikroskopů, které v projektu bude využívat.

V roce 2018 bude pořízen přístroj pro automatizované zamrazování za vysokého tlaku (Leica EM ICE), zařízení pro mrazovou substituci (Leica EM FSP) a zamrazovací zařízení tenkých tekutých vzorků (Leica EM GP), které budou sloužit zejména v rámci aktivit VP2. Technická specifikace je uvedena v příloze 10.

Elektronová mikroskopie bude zahrnovat transmisní elektronový mikroskop FEI Morgagni, rutinní mikroskop vybavený CCD kamerou Mega View III se softwarovým vybavením iTEM (Olympus SIS) a tomografický elektronový mikroskop Tecnai G2 Sphera 20 s LaB6 katodou. Mikroskop je momentálně vybavený 4 megapixelovou "slow scan" CCD kamerou Gatan USC 1000 (Model 894). V roce 2018 je v rámci projektu plánováno pořízení vysoce citlivé kamery 16 MP CMOS, která výrazně zvýší úroveň mikroskopu zejména pro strukturní charakterizaci vitrifikovaných vzorků. K mikroskopu jsou k dispozici kryodržáky Gatan 626 s Gatan 914 s možností vysokorezoluční analýzy a 3D rekonstrukcí vitrifikovaných vzorků.

V roce 2018 bude též vylepšena analýza MR/CT obrazů zakoupením výkonného počítače iMac a multilicence software VGStudio Max 3.0 pro zpracování a analýzu medicínských obrazů a automatickou nebo poloautomatickou segmentaci a následnou tvorbu 3D animací. Toto zařízení je klíčové především pro aktivitu 6 výzkumného cíle 1 VP2 (obr. 5.2.1), tj. pro vývoj nových kontrastních látek pro MR.

**VaV partnerského centra EEM ÚPT AV ČR** plánuje modernizovat přístrojové a softwarové vybavení ve 3 oblastech.

V roce 2018 bude pořízen software potřebný pro simulace proudění plynů a charakterizaci distribuce tlaku plynu v komoře vzorku EREM a diferenciallyně čerpaných komorách EREM a pro simulace přestupů tepla v oblasti držáku vzorku a vzorku. Software by měl umožňovat Computational Fluid Dynamics (CFD) simulace a měl by být použitelný pro rozsáhlé spektrum výzkumných aplikací. Software by měl mít širokou oblast fyzikálních a chemických modelů či

jejich kombinací a umožňovat modelování širokého spektra úloh (proudění, sdílení tepla konvekcí, vedení a sáláním, modelování chemických reakcí, vícefázové proudění se sdílením tepla). Důležitá je také rychlá stavba modelu, efektivní tvorba výpočetní sítě, provedení výpočtu s přesnými výsledky, paralelizace úloh na více procesorech nebo jádrech a možnost implementace vlastních modelů, pozastavit výpočet, změnit nebo zkorigovat nastavení a poté pokračovat ve výpočtu. Dále bude pořízen software nebo doplněk pro modifikaci CAD modelů, využívaných pro simulace. Měl by umožnit modifikaci CAD modelů nebo úplnou tvorbu a úpravu 2D a 3D geometrií pro CFD simulace. Software by měl být schopný vytvářeny objemové, skořepinové a nosníkové modely pevných částí pro strukturální a teplotní výpočty a měl by umožnit ukládání jednotlivých úkonů a jejich zpětnou editaci a tím umožnit rychlé provedení všech konstrukčních změn a aktualizací. Dále by v možnostech softwaru měla být tvorba 2D skic pomocí jednoduchých křivek, 3D operace a vytváření 3D těles z 2D skic, parametrické vytváření modelů (rozměrové parametry), import modelů vytvořených v externích CAD programech, úprava stávajících i importovaných modelů a příprava modelu pro objemové síťování.

Výše uvedený komplex software je nezbytně nutný k výpočtům rychlostí a tlaků plynu v prostoru diferenciálně čerpané komory a komory vzorku EREM, přesněji k charakterizaci okrajových podmínek pro simulace interakcí primárního elektronového svazku s plynem, řešeno jako hlavní výzkumné téma v rámci VP 3, Cíle 1 a interakcí signálních elektronů s plynem a vývoj nových detektorů pro EREM, řešeno v rámci VP3, cíle 2. Software je také velmi důležitý pro komplexní charakterizaci environmentálních vlivů působících na citlivé biologické a polymerní vzorky v komoře vzorku EREM a vývoj speciálních metod pro tyto vzorky v rámci VP3 cíle 3.

Dále bude pořízen doplňkový software k EDS analyzátoru mikroskopu QUANTA FEG 650, který bude využit při charakterizaci vysoce citlivých vzorků. V rámci řešení VP 3, cílů 1, 2 a 3 je nutné zakoupit doplňkový software k EDS analyzátoru. Software umožní pomocí detekovaných X-ray spekter kvantifikovat rozptyl primárního elektronového svazku v závislosti na operačních parametrech (tlak a typ plynu, energie a proud svazku, pracovní vzdálenost) EREM a vývoj metod pro potlačení těchto parazitních vlivů na přesnost detekovaných spekter v rámci řešení Cíle 1 a 3 VP 3. Nově umožní získat vysoce přesné kvantitativní výsledky energiově disperzní prvkové X-Ray mikro-analýzy ze vzorků složených převážně z lehkých prvků v podmínkách nízkých proudů elektronového svazku a to díky kvantifikaci založené na přítomnosti standardů a díky velké ploše CCD čipu. Těchto možností bude využito při EDS analýze biologických a polymerních vzorků v rámci cíle 3 a 4 VP 3. Software dále umožní měření tenkých elektricky vodivých vrstev s tloušťkami dovolujícími při vysokých energiích primárního svazku elektronů průchod skrz. K měření tloušťky bude využita metoda Cliff-Lorimer (TEM, STEM a SEM). Výše uvedená možnost měření tlouštěk tenkých vrstev bude využita při výzkumu a vývoji nových detektorů pro REM a EREM realizovaného v rámci výzkumného cíle 2. Novou možností zakoupeného balíčku doplňkových softwarů bude také hledání podobného spektra a možnost rozlišení překrývajících se X-ray spekter, automatická částicová analýza a další možnosti automatického zpracování spekter vzorků s lehkými prvky v prostředí vysokého tlaku plynů v EREM.

V rámci řešení Cílů 3 a 4 VP3 s návazností na VP1 a VP2 se plánuje nákup konfokálního laserového rastrovacího mikroskopu pro korelativní mikroskopii. Jedním z hlavních cílů navrhovaného projektu je korelativní mikroskopie technik EREM, optické fluorescenční mikroskopie a Ramanovy spektroskopie, doplněná technikami pro mechanickou a bezkontaktní laserovou mikro-manipulaci s živými biologickými vzorky (například buňkami) a

jejich následná integrace do komory vzorku EREM. Vznikne tak unikátní analytický nástroj, po doplnění o speciální detekční systémy realizované v rámci VP3, cíle 2, jedinečný na světě. Nově zakoupený světelný fluorescenční mikroskop bude využit nejen ke studiu barvených tkání ve fixovaných vzorcích, ale i živých vzorků a dalších vysoce citlivých materiálů a polymerů. Z tohoto důvodu bude mikroskop nadstandardně vybaven lasery s vlnovými délkami v rozsahu 400-800 nm. Mikroskop bude také vybaven Ramanovým spektrometrem, který bude mimo jiné využit i pro testování a kalibraci zařízení integrovaných do EREM. Umístěním fluorescenčního mikroskopu v těsné blízkosti EREM vznikne komplex zařízení, technicky i pozičně vhodně konfigurovaných pro minimalizaci doby transferu vzorků a zamezení vzniku artefaktů a degradace živých vzorků. Také vzhledem k rozsahu plánovaných prací v projektu by bylo využití jiného podobně vybaveného optického mikroskopu z časového a finančního hlediska neefektivní, nerentabilní a vzhledem k plánovaným modifikacím a propojení obou přístrojů nereálné.

V rámci realizace VaV aktivit VP 3, cíle 4 je plánován i nákup níže uvedených komponent, pomocí kterých bude realizována integrace fluorescenčního mikroskopu, Ramanova spektrometru a laserového mikromanipulačního systému do nového EREM QUANTA 650 FEG. Vlastnosti jednotlivých komponent závisí na účelu jejich použití. Pro Ramanovu spektroskopii je nutný laser s velmi úzkou spektrální šířkou. Laser pro optické mikro-manipulace musí mít velmi dobře definovaný příčný profil a jeho vlnová délka nesmí poškozovat zkoumané objekty. Kamera pro Ramanovu spektroskopii vyžaduje velmi vysokou citlivost a velmi nízkou úroveň šumu. Seznam a charakterizace nakupovaných komponent:

Ramanovský laser určený pro vybuzení Ramanova signálu o vlnové délce 785 nm a velmi úzké spektrální čáře. Tato vlastnost je důležitá pro kvalitní rozlišení detekovaných spekter.

Spektrograf pro detekci Ramanova rozptylu. Bude potřeba ho osadit více typy mřížek, pro detekci jak v širokém spektrálním pásmu, tak i pro detailní zkoumání vzorku.

Spektroskopická kamera pro detekci Ramanova signálu za spektrografem. Z důvodu velmi nízké intenzity detekovaného světla je potřeba kamera s vysokou citlivostí a kvalitním potlačením šumu. Tyto vlastnosti mají kamery chlazené na teploty nižší než -100 °C.

Fluorescenční lampa k vybuzení fluorescence na vzorku. Díky různým používaným barvivům je potřeba měnit emitovanou vlnovou barvu, například změnou filtrů nebo přepínáním laserových diod.

Fluorescenční kamera určená pro detekci fluorescence emitované ze vzorku. Fluorescenční signál je slabý a je potřeba aby kamera měla zvýšenou citlivost a potlačený šum. Toho je dosaženo chlazením pomocí Peltierova článku. Pro kvalitní detekci obrazu je třeba rozlišení minimálně VGA.

Chytací laser pro optické manipulace o vlnové délce 1064 nm a výkonu minimálně 1 W. Vlnová délka je určena tak, aby nedocházelo k absorpci záření biologickým preparátem a zároveň byla minimalizována absorpce ve vodě.

Mikroskopové objektivy s vysokou numerickou aperturou určené pro zabudování do komory mikroskopu budou muset být použitelné do vakua. Zvětšení objektivů bude 60X nebo 100X.

Vychylovací systém pro prostorové polohování laserového svazku určené pro tříosé polohování laserového svazku v rovině vzorku. Bude umístěno v komoře mikroskopu.

Kamerový objektiv umístěný před fluorescenční kameru. Určený pro přeastření obrazu do jiných rovin vzorku.

Počítač a řídicí karty řízení experimentální aparatury.

Optika, mechanika, filtry, vakuové díly, tj. komponenty určené do optické sestavy. Komponenty bude třeba vybírat s ohledem na to, že budou zabudovány do vakuové komory mikroskopu.

Optické vlákna, optika, mechanika, tj. komponenty určené pro zavedení laserového záření do komory mikroskopu. Budou umístěny mimo vakuovou komoru.

Chemie a laboratorní potřeby určené pro čištění optických komponent a pro přípravu vzorků.

## 7. ADMINISTRACE A ŘÍZENÍ PROJEKTU

Administrativní tým projektu sestává ze zástupce ředitele projektu (0,2 FTE), projektového manažera (1 FTE), asistentky projektového manažera (0,1 FTE), administrativní síly ÚPT AVČR (1 FTE) a 2 administrativních pracovníků na částečné kapacity (0,2 a 0,4 FTE u partnerů IKEM a ÚMCH) pro koordinaci v rámci výzkumného programu 2, který bude realizován v zapojení dvou pracovišť a proto vyžaduje větší míru administrativní koordinace. Tým je navržen v maximální možné míře účelnosti a je detailně popsán v kapitole 3 v odstavci plánované organizační struktury projektu. Specifikace členů je uvedena v povinné příloze realizační tým a zdůvodnění mzdových nákladů v komentáři k rozpočtu (příloha 9).

### 7.1. Analýza rizik

#### 7.1.1. Analýza rizik - aktivity a, d, e, f

Během přípravy projektu byly aktivity a), d), e) a f) vyhodnoceny z hlediska možných rizik a následující text uvádí jejich souhrn a opatření k jejich eliminaci. Souhrn opatření bude realizován v prostředí navržené organizační struktury centra excelentního výzkumu, které je podrobně popsáno v kapitole 3.3 a v popisu složení výzkumných týmů jednotlivých výzkumných programů v kapitolách 5.1.5, 5.2.5 a 5.3.5. Opatření k eliminaci rizik ve všech aktivitách se budou řídit principem kontingence, tj. průběžným posuzováním souběhu jednotlivých rizik a návrhem jejich řešení radou projektu, jak je uvedeno v následujícím textu.

**Hlavní rizika, které byla identifikovány pro aktivitu a) tj. podporu výzkumu,** který dosáhne svou kvalitou a originalitou mezinárodní excelence, čímž dojde ke zvýšení výzkumného výkonu výzkumných center, jsou uvedena dále s uvedením pravděpodobnosti výskytu (P) a vlivu na celkový úspěch projektu (V):

- 1) Nedostatečná kvalita práce jednotlivých členů odborného týmu příslušného programu, špatné protokolování či absence protokolování, nedodržování předepsaných postupů, atd. P 60%, V 60%.
- 2) Nedodržení termínů naplánovaných činností členy týmů, P 60%, V 40%.
- 3) Neplnění dohodnutého postupu řešení daného problému členy týmů, P 20%, V 60%.
- 4) Zatajování neúspěchů v naplánovaném postupu či předstírání nereálných dat, podvádění, P 5%, V 80%.
- 5) Nemožnost dosáhnout cíle zvoleným postupem, P 60%, V 20%.
- 6) Nedostatečná aktivita zapojených laboratoří věnovaná úkolům projektu, P 5%, V 80%.
- 7) Nedostatečná kvalita výstupů zapojených laboratoří znemožňující publikace ve špičkových vědeckých časopisech, P 5%, V 80%.

- 8) Odklon zapojených laboratoří od dohodnuté tematiky projektu, P 5%, V 80%.
- 9) Nedostatečná aktivita VaV center věnovaná aktivitám projektu, P 5%, V 60%.
- 10) Odklon zapojených VaV center od dohodnuté tematiky projektu, P 5%, V 80%.

**Opatření k předcházení a eliminaci dopadů rizik spojených s aktivitou a) jsou navržena takto:**

Vzhledem k povaze práce v základním výzkumu v oblasti biologie, chemie i vývoje instrumentace se bude řešení těchto rizik řídit kontingenčním přístupem, který je charakterizován neustálým hledáním nejvhodnějších metod řešení a též řízení těchto řešení pro danou situaci, tj. pro danou fázi výzkumu. Předpokladem aplikace tohoto přístupu je především důslednost ve vykazování výsledků vědecké práce, dobrá struktura týmu a flexibilní přístup vedení jednotlivých týmů. Základem eliminace rizik v této oblasti budou pravidelné schůzky řešitelských laboratoří, které budou pro každý výzkumný program vedeny vedoucími příslušných aktivit či celého programu (viz obr. 3.4 a 5.1.5, 5.2.3 a 5.3.5). Periodicita těchto schůzek je navrhována 1x týdně pro tým řešící konkrétní aktivitu, 1x měsíčně pro tým řešící výzkumný cíl a 4x ročně pro výzkumný program a 1x ročně pro celé centrum excelentního výzkumu.

Opatření k předcházení a eliminaci dopadů rizik jsou rozdělena do třech skupin v závislosti na závažnosti rizika, od nejmenšího, do nejvyššího. Pro každou skupinu jsou navržena řešení zahrnující i souběh více rizik:

**Rizika 1-5** budou co možná nejdůsledněji řešeny na nejnižší úrovni tj. v rámci týmů řešících konkrétní aktivitu. Vedoucí příslušné výzkumné aktivity bude prostřednictvím týdenních schůzí s týmem a navíc pravidelným kontaktem minimálně dvakrát týdně s jednotlivými pracovníky, monitorovat možný výskyt rizik 1-5 a ze své kompetence tyto řešit navržením nápravy s využitím alternativních postupů či motivací ke změně strategie. V případě nemožnosti dosažení nápravy bude řešit toto riziko neodkladně s vedoucím výzkumného programu, se kterým bude mít pravidelné měsíční schůzky a který navrhne řešení zahrnující případné personální řešení.

**Pro rizika 5-8** je klíčová kompetence vedoucího příslušného výzkumného programu (1-3), který bude tato rizika řešit na pravidelných schůzích 4x ročně. Výstupem těchto schůzí bude seznam opatření k nápravě identifikovaných rizik.

**Pro rizika 9 a 10** je klíčová kompetence ředitele centra excelentního výzkumu, který bude eliminovat tyto rizika na pravidelných schůzích řídicí rady projektu pro výzkum a vývoj (Obr. 3.4), která bude zasedat minimálně čtyřikrát ročně. Zasedání může být též svoláno v případě nutnosti řešení neočekávaných problémů (zpoždění řešení dílčích úkolů, technické problémy). Výsledky jednání rady budou závazné pro všechny účastníky projektu. Zápisy z jednání budou přílohami dílčí nebo závěrečné zprávy. Zasedání rady bude probíhat za osobní účasti všech členů rady.

**Rizika, které byla identifikovány pro aktivitu d) tj. rozvoj výzkumných týmů** - podpora výzkumu prostřednictvím podpory či zvýšení počtu výzkumných týmů včetně jejich dlouhodobého rozšíření o domácí či zahraniční výzkumné či technické pracovníky, jsou uvedena dále s uvedením pravděpodobnosti výskytu (P) a vlivu na celkový úspěch projektu (V):

- 1) Neefektivní dělba práce v týmech řešících konkrétní výzkumnou aktivitu, P 20%, V 40%.
- 2) Neefektivní dělba práce mezi týmy výzkumného cíle, P 40%, V 40%.
- 3) Chybějící kapacity či dostatečně kvalifikovaní členové týmů, P 20%, V 60%.



4) Neschopnost zajistit budoucnost existence týmu, hlavně během období udržitelnosti navrhovaného projektu, P 20%, V 60%.

5) Neefektivní dělba práce v rámci výzkumného programu. Nevyužívání možností zapojování zahraničních pracovníků, P 20%, V 60%.

6) Posun skladby týmů výzkumného programu ohrožující udržitelnost celého programu, P 5%, V 60%.

7) Neefektivní dělba práce v rámci centra excelentního výzkumu. Nevyužívání možností zapojování zahraničních pracovníků, P 40%, V 60%.

**Opatření k předcházení a eliminaci dopadů rizik spojených s aktivitou d) jsou navržena takto:**

Jedním z hlavních rizik vědecké práce obecně je neefektivní vedení týmů. Na eliminaci tohoto rizika bude proto kladen velký důraz za účelem zvýšení výkonnosti týmů. Opatření k eliminaci rizik jsou rozdělena do třech skupin v závislosti na závažnosti rizika, od nejmenšího, do nejvyššího. Pro každou skupinu jsou navržena řešení zahrnující i souběh více rizik:

**Řešení rizik 1-2** bude v kompetenci vedoucích výzkumných aktivit prostřednictvím jejich průběžného dohledu nad postupem prací, ale hlavně průběžnou interakcí se všemi členy týmu, včetně techniků a studentů. Vedoucí pracovníci týmů budou povinni každý týden osobně konzultovat se všemi členy týmů včetně techniků a studentů průběžný stav. Možnosti zvýšení efektivity budou uplatňovat okamžitě, bez prodlení, návrhem změny k vylepšení stavu.

**Rizika 3-5** budou řešena formou pravidelných schůzek vedoucího výzkumného programu s vedoucími jednotlivých týmů. Pravomocí vedoucího programu bude v případě výskytu rizika navrhnout personální či technické opatření k nápravě. Jeho kompetencí bude též trvale sledovat možnosti nábory zahraničních výzkumníků a hlavně průběžně zjišťovat možnosti grantových aplikací do mezinárodních soutěží a stimulovat členy týmů k aplikacím.

**Rizika 6-7** budou řešena přednostně ředitelem centra, jehož povinností v tomto ohledu bude nejen na pravidelných schůzkách zjišťovat stav, ale především aktivně komunikovat s vedoucími všech třech programů a navrhnout řešení průběžně.

**Rizika, které byla identifikovány pro aktivitu e)** tj. rozvoj internacionalizace - posílení mezinárodní dimenze a intenzivní vědecké spolupráce s alespoň jednou přední organizací pro výzkum a šíření znalostí v zahraničí v návaznosti na podporovanou aktivitu a), jsou uvedena dále s uvedením pravděpodobnosti výskytu (P) a vlivu na celkový úspěch projektu (V):

1) Nedůslednost v uskutečňování dohodnutých aktivit se zahraniční institucí, P 20%, V 40%.

2) Malá aktivita členů odborných týmů v navazování nových mezinárodních kontaktů, P 20%, V 60%.

3) Neschopnost vytvořit kvalitní podmínky pro členy týmů centra excelentního výzkumu k realizaci kontaktů se zahraniční institucí, P 20%, V 60%.

**Opatření k předcházení a eliminaci dopadů rizik spojených s aktivitou e) jsou navržena takto:**

Návrh projektu obsahuje popis spolupráce se strategickým partnerem Prof. Frimlem z IST Austria, ale též pro každý výzkumný cíl popis řady dalších spolupracujících laboratoří. Rizika 1-3 spojená s realizací těchto spoluprací budou řešena formou kontroly ředitele centra a vedoucích výzkumných programů na pravidelných schůzkách 4x ročně. Zpráva z těchto jednání bude obsahovat návrh nápravy v případě snižující se intenzity mezinárodní spolupráce.

Rizika, které byla identifikovány pro aktivitu f) řízení projektu, jsou uvedena dále s uvedením pravděpodobnosti výskytu (P) a vlivu na celkový úspěch projektu (V):

- 1) Neplnění monitorovacích indikátorů projektu, P 20%, V 80%.
- 2) Nekázeň ve finančním hospodaření projektu, P 20%, V 80%.
- 3) Problémy spojené se špatnou institucionální podporou VaV centra zahrnující podmínky výběrových řízení pro nákup vybavení, personální politiku a správu duševního vlastnictví, P 20%, V 60%.
- 4) Konflikty v rámci řešitelské struktury navrhovaného centra, zahrnující též konflikty v oblasti duševního vlastnictví výsledků výzkumu, P 20%, V 80%.

Opatření k předcházení a eliminaci dopadů rizik spojených s aktivitou f) jsou navržena takto:

Základním nástrojem pro eliminaci rizik této aktivity je řídicí rada administrace projektu (Obr. 3.3), která svou činností popsanou v kap. 3.3 je bude efektivně eliminovat. Rada bude zasedat minimálně čtyřikrát ročně. Zasedání může být též svoláno v případě nutnosti řešení neočekávaných problémů (finanční problémy, personální a administrativní záležitosti). Výsledky jednání Rady, která se ve svém jednání bude řídit principy kontingence, budou závazné pro všechny účastníky projektu. V případě řešení konfliktů se Rada bude řídit zněním Smlouvy o partnerství, která je již předběžně schválena navrhovatelem a všemi partnery a připravena k podpisu pro druhé kolo hodnocení. V oblasti ošetření intelektuálního vlastnictví bude projekt též využívat specializované patentové oddělení partnera ÚMCH AVČR.

Jak je uvedeno v tabulce 7.1, většina rizik aktivit a), d), e) a f) se nachází v oblasti středního nebezpečí, je tak dobrá záruka, že projekt nebude čelit zásadním problémům.

Pravděpodobnost	Vliv	Velmi nízký 5%	Nízký 20%	Střední 40%	Vysoký 60%	Velmi vysoký 80%
Velmi vysoká	80%					
Vysoká	60%		a5	a2	a1	
Střední	40%			d2	d7	
Nízká	20%			d1, e1	a3, d3, d4, d5, e2, e3, f3	f1, f2, f4
Velmi nízká	5%				a9, d6	a4, a6, a7, a8, a10

**Tabulka 7.1: Kontingenční tabulka rizik shrnující pravděpodobnosti a vlivy jednotlivých rizik spojených s aktivitami a), d), e) a f).** Míra nebezpečí pro projekt je vyjádřena barevně jako nízká (bílá), střední (oranžová) a vysoká (červená).

### 7.1.2. Analýza rizik – aktivita b

Během přípravy projektu byla aktivita b) vyhodnocena z hlediska možných rizik a následující text uvádí jejich souhrn a opatření k jejich eliminaci. Souhrn opatření bude realizován v prostředí navržené organizační struktury centra excelentního výzkumu, které je podrobně popsáno v kapitole 3.3 a v popisu složení výzkumných týmu jednotlivých výzkumných programů v kapitolách 5.1.5, 5.2.5 a 5.3.5.

**Hlavní rizika, které byla identifikovány pro aktivitu b) tj. materiálně, technicky a informačně podpořit a umožnit výzkumné aktivity,** v návaznosti na podporovanou aktivitu a), jsou uvedena dále s uvedením pravděpodobnosti výskytu (P) a vlivu na celkový úspěch projektu (V):

**1)** Problémy ve výběrových řízeních a v uvedení zařízení do provozu dané nedůsledností při dodržování časového plánu nákupů a jejich administrace. P 20%, V 40%.

**2)** Problémy spojené s nefunkčností či poruchovostí nového zařízení a servisním zajištěním. P 40%, V 40%.

**3)** Problémy spojené se zaškolením pracovníků na nových přístrojích. P 5%, V 40%.

**4)** Problémy spojené s radikální změnou plánované technologie a její dostupností. P 20%, V 40%.

**5)** Problémy s investičním vybavením instalovaným v prostorách, které nejsou v majetku příjemce či partnera. P 5%, V 60%

**6)** Problémy s financováním vybavení. P 40%, V 40%.

**Opatření k předcházení a eliminaci dopadů rizik spojených s aktivitou b) jsou navržena takto:**

**Pro rizika 1 a 5** je klíčová kompetence ředitele centra excelentního výzkumu, který bude eliminovat tato rizika na pravidelných schůzích řídicí rady projektu pro výzkum a vývoj (Obr. 3.4), která bude zasedat minimálně čtyřikrát ročně. Zasedání může být též svoláno v případě nutnosti řešení neočekávaných problémů (zpoždění řešení dílčích úkolů, technické problémy). Výsledky jednání rady budou závazné pro všechny účastníky. K předcházení rizika 1 bude klíčová spolupráce s příslušným oddělením pro výběrová řízení institucí zapojených VaV center, které je u všech partnerů k dispozici. Důležité je přitom sepsání kvalitní zadávací dokumentace, na jejímž základě lze vybrat nejlepší řešení. Výběrová řízení jsou plánována na počátek období řešení projektu a je dobrým předpokladem, že proběhnou bez problémů. V řadě případů se jedná o upgrade stávajících přístrojů, kde je řízení jednodušší. V případě eliminace rizika 5 budou důsledně ošetřeno formou smlouvy případná demontáž a odvezení vybavení, pravděpodobnost tohoto rizika je však velmi nízká a týká se využití elektronových mikroskopů VaV centra IKEM.

Pro řešení situací spojených s předcházením a eliminací případných dopadů **rizik 2-4 a 6** je klíčová kompetence vedoucího příslušného VP (1-3), který bude tato rizika řešit na pravidelných schůzích 4x ročně. Výstupem těchto schůzí bude seznam opatření k nápravě identifikovaných rizik. V oblasti rizika 2 bude dbáno na co nejrychlejší řešení formou reklamace či výměně za jiný kus, též bude důsledně vedena agenda zajišťující důsledné dodržení záručních podmínek. V oblasti rizika 3 budou mít klíčový výzkumní pracovníci zajišťující provoz přístrojů vyhrazenou část své pracovní doby pro zaškolování nových pracovníků. Předcházení riziku 4 je v projektu zajištěno kvalitou nominovaných členů a jejich trvalým kontaktem s vývojem na poli instrumentální techniky, též nelze předpokládat, že se technologie dramaticky změní do začátku projektu. Předcházení riziku 6 bude realizováno formou pravidelného kontaktu administrace projektu s poskytovatelem dotace a případná zdržení budou eliminována i dočasným financováním ze zdrojů navrhovatele či partnera s následným převedením financí po jejich obdržení od poskytovatele.

Jak je uvedeno v tabulce 7.2, většina rizik se nachází v oblasti malého či středního nebezpečí pro projekt.

Pravděpodobnost	Vliv	Velmi nízký 5%	Nízký 20%	Střední 40%	Vysoký 60%	Velmi vysoký 80%
Velmi vysoká	80%					
Vysoká	60%					
Střední	40%			<b>b2, b6</b>		
Nízká	20%			<b>b1, b4</b>		
Velmi nízká	5%			<b>b3</b>	<b>b5</b>	

**Tabulka 7.2: Kontingenční tabulka rizik shrnující pravděpodobnosti a vlivy jednotlivých rizik spojených s aktivitou b.** Míra nebezpečí pro projekt je vyjádřena barevně jako nízká (bílá), střední (oranžová) a vysoká (červená).

## 8. ROZPOČET

Specifikace rozpočtu pro jednotlivé roky řešení je uvedena v příslušné části žádosti o podporu a též v příloze 8. Popis adekvátnosti a hospodárnosti nákladů na mzdy odborného a administrativního týmu, na pořizované služby a další náklady jsou detailně popsány v příloze 9.

### 8.1. Zajištění spolufinancování v realizační fázi

Žadatel ÚEB AVČR (VVI) a dva další VVI partneři navrhovaného projektu (ÚMCH AVČR a ÚPT AVČR) jsou připraveni spolufinancovat v objemu 5%, partner IKEM (OSS) má zákonem danou spoluúcast 0%. Spolufinancování je specifikována za jednotlivé roky řešení v příslušné části žádosti o podporu a též v příloze 8. Hlavním zdrojem dofinancování bude institucionální podpora AV ČR a v menší míře i zdroje z ekonomické činnosti jednotlivých partnerů (patenty, užité vzory, uznané odrůdy, atd.).

## 9. UDRŽITELNOST

### 9.1. Udržitelnost aktivit a, d, e, f

Tento projekt je předkládán na základě analýzy dosavadního vědeckého výkonu zapojených laboratoří, kterou pečlivě provedli vedoucí zapojených pracovišť. V této analýze byla brána v úvahu především schopnost vedoucích členů zapojených týmů dlouhodobě vykonávat vědeckou činnost na základě průběžného získávání finančních prostředků z grantových soutěží, domácích i zahraničních. Všechna zapojená VaV centra tj. navrhovatelské mikroskopické centrum VaV ÚEB AVČR a partnerská centra SUPRAMOL ÚMCH AVČR, ZRIR IKEM i EEM ÚPT AVČR vyhovují velice dobře parametrům dlouhodobě udržitelného rozvoje, který v jejich případě nebyl nikdy závislý na jednorázových, velkých dotacích nadnárodního, státního či institucionálního charakteru, spojených např. s výstavbou nových výzkumných center. Jak je dokumentováno v kapitole 3 (včetně tam zmiňovaných příloh), v životopisech excelentních a klíčových členů týmů (příloha 7) a ve výčtu publikačních, projektových a patentových úspěchů těchto pracovníků (kapitoly 5.1.5, 5.2.5 a 5.3.5), je ve všech případech splněn základní a naprosto klíčový parametr. Tímto parametrem je poměr nákladů k výkonu, který je u všech subjektů vstupujících do projektu ve velmi dobré rovnováze a spíše se jasně přiklání k převaze výkonu nad náklady. Tuto z hlediska čerpání veřejných prostředků, velice

dobrou a mravně vyspělou praxi, hodláme podpořit i navrhovaným projektem a v této praxi budeme pokračovat i po jeho skončení, v době jeho udržitelnosti. Činnost zapojených laboratoří by jistě mohla velice dobře pokračovat i bez prostředků z navrhovaného projektu, nebylo by ovšem možné vůbec uvažovat o základním přínosu celého projektu, tj. o interdisciplinárním přesahu, který zásadně rozvíjí navrhovatelské VaV centrum, ale stejným způsobem zasahuje partnerská pracoviště.

V návaznosti na právě popsanou logiku předkládaného projektu, bude v jeho průběhu kladen důraz na vědeckou i finanční udržitelnost i pro období po jeho ukončení. Jak vyplývá z nastavení hodnotících indikátorů, jsou navrhovaným projektem plánovány v době jeho realizace plánovány celkem 4 účasti v projektech mezinárodní spolupráce, tj. hlavně v EU programu Horizont 2020 v programu INTER-EXCELENCE, který nahrazuje řadu končících projektů dvoustranné i mezinárodní spolupráce, ve kterých jsou členové navrhovatelského VaV centra i partnerů dlouhodobě úspěšnější (viz kapitola 3 a příloha 3).

Finanční prostředky z těchto projektů budou tvořit ale jen část prostředků. Další přinesou jednotliví vedoucí vědečtí pracovníci zapojených týmů formou účastí v domácích a mezinárodních grantových aplikacích. V týmu je člen, který v minulosti aplikoval o prestižní ERC grant a je předpoklad jeho opětovného podání v rámci ERC consolidator grants ve druhé polovině realizace projektu (Jan Petrášek). Je dobrá předpoklad, že i další členové týmu Martin Hrubý (ÚMCH AVČR) a Martin Heger (ÚPT AV ČR) budou aplikovat v rámci ERC a navrhovaný projekt jim k tomu vytvoří velmi dobrou pozici. Jak vyplývá z příložených CV členů řešitelského kolektivu, většina zapojených pracovníků je schopna pravidelně získávat grantové prostředky z dalších grantových agentur jako je GAČR, ale i z programů mezinárodní spolupráce MŠMT. Navrhované centrum excelence VaV centra ÚEB AVČR je i partnerem projektu v rámci programu "Národní výzkumná infrastruktura pro biologické a medicínské zobrazování" projektu Czech Bioimaging (CzBI), podpořeného účelovou podporou MŠMT pro velké infrastruktury pro výzkum, experimentální vývoj a inovace (LM2015062, 2016-2019). Prostřednictvím tohoto projektu je tak mikroskopická jednotka VaV centra ÚEB AVČR zapojena do cestovní mapy ČR velkých infrastruktur a do evropské sítě Euro-BioImaging v rámci sítě ESFRI (European Strategy Forum on Research Infrastructures). Toto zapojení dává velice unikátní možnost zisku dalších prostředků účastí v plánovaných projektech panevropských infrastruktur ESFRI.

Představené možnosti jsou velice dobrým základem pro dodržení parametrů nastaveného výkonu během období udržitelnosti, jak jsou uvedeny v tabulce 9.1. Neméně důležitým zdrojem financování v období udržitelnosti je finanční zisk, který je spíše dlouhodobějšího charakteru a spočívá v patentování některých řešení, které vyplynou z aktivit projektu, jako je vývoj instrumentace a nanočásticových systémů pro využití v rostlinných biotechnologiích i klinických aplikacích.

### **Popis výsledků cost-benefit (CBA) analýzy**

Kompletní CBA analýza je součástí povinných příloh v systému MS2014+. V tomto textu se uvádí základní požadované informace o její struktuře a parametrech jednotlivých položek.

#### *Investice*

Tabulka investičních nákladů na záložce Investice a zdroje odpovídá rozpočtu projektu. Do tabulky jsou tedy zadávány jak investiční, tak i neinvestiční položky rozpočtu projektu.

#### *Zdroje*

Zdroje financování uvedené na záložce Investice a zdroje jsou v souladu s výzvou a předpokládají dofinancování ve výši 5%, toto dofinancování bude hrazeno z institucionálních prostředků žadatele a partnerů jak je uvedeno též v kap. 8.1.

#### *Provozní a finanční náklady*

Na záložce provozní náklady a výnosy uvádíme předpokládané finanční toky spojené s projektem po ukončení podpory z prostředků OP VVV. Stanovené provozní náklady umožňují zajištění udržitelnosti projektu a dosažení deklarovaných cílů, včetně socio-ekonomických dopadů) projektu.

#### *Provozní výnosy*

Financování provozních a finančních nákladů je rozděleno na provozní výnosy a financování provozní ztráty. Položka provozní výnosy představuje zejména hospodářskou činnost realizovanou díky projektu (smluvní výzkum, prodej patentů a práv, apod.). V tomto směru předpokládáme, že v krátkém období po ukončení projektu (v období dvou let) budeme moci část nákladů hradit ze smluvního výzkumu, který vzejde ze dvou mezinárodních patentů. Provozní a finanční náklady však značně převyšují Provozní výnosy a budou tedy financovány z jiných zdrojů jako financování provozní ztráty. Tyto zdroje pro finanční udržitelnost, které budou použity na úhradu provozní ztráty projektu, jsou zejména účelové prostředky poskytované MŠMT, GAČR, TAČR a dalšími veřejnými institucemi, příjmy z mezinárodních grantů (7. RP, Horizont 2020, FP9), institucionální prostředky AVČR, ev. ostatní zdroje financování.

#### *Zůstatková hodnota*

S ohledem na skutečnost, že projekt nevytváří zisk, je zůstatková hodnota nulová.

#### *Finanční analýza*

Pro potřeby ověření finanční udržitelnosti je rozhodující výsledek na záložce Udržitelnost pro FA (udržitelnost = ano). Toto kritérium projekt splňuje.

#### *Socioekonomické dopady*

Počet vytvořených pracovních míst (FTE) odpovídá počtu pracovních míst přímo vytvořených projektem. Počet vytvořených pracovních míst (FTE) je zadáván ve všech letech hodnocení po dobu, kdy budou daná pracovní místa obsazena. A to v rozdělení na místo dopadu (Praha, Brno). Vzhledem ke kvalitě týmu je předpoklad udržení počtu FTE v prvním roce po ukončení projektu na úrovni posledního roku jeho řešení s následnou mírným poklesem, který je spíše dán přibližným odhadem uvažujícím stárnutí týmu a příliš daleké budoucnosti. Opatření, která přispějí k udržitelnosti, zahrnují především strategie popsané v kapitole 7.1, tj. v analýze rizik a především ve způsobech jejich odhalování a řešení. Činnost centra bude i v oblasti zajištění budoucí udržitelnosti podřízena kontingenčnímu způsobu řízení s cílem zajistit udržitelnost vědeckých aktivit, strukturu týmu, mezinárodní vazby a efektivní řízení projektu. Na základě výsledku projektu je možné, že některé zapojené laboratoře budou během období udržitelnosti personálně posíleny, některé naopak redukovány. Vzhledem k širokému zapojení studentů a mladších vědeckých pracovníků lze očekávat, že v budoucnosti tito pracovníci budou přirozeně obnovovat stávající kolektiv. Tato praxe je v oblasti základního výzkumu běžná a není k ní žádná alternativa.

Do socioekonomických dopadů byl přidán také objem smluvního výzkumu a patentů ve výši 250 tis. Kč od r. 2024, shodně s plánovanými výnosy ve finanční analýze. Projekt má díky své povaze i dobrý potenciál získat více prostředků na udržení své existence z těchto zdrojů, nelze je však v současné době přesně vyčíslit.

Hodnota socioekonomických dopadů zachycujících výsledky vědecké činnosti za projekt (publikace a patenty) je zadávána v souladu s definicí RIV a také v souladu s plánovanými indikátory projektu. Počty recenzovaných článků v impaktovaných časopisech v databázi Web of Science a Scopus korespondují s indikátory 2 02 16 (Odborné publikace se zahraničním spoluautorstvím) a 2 02 11 (Odborné publikace vytvořené podpořenými subjekty).

#### *Ekonomická analýza*

Pro potřeby ověření pozitivního dopadu projektu na společnost je rozhodující záložka Návratnost investic pro EA, kde čistá současná hodnota musí být vyšší než 0, tuto podmínku projekt splňuje.

## **9.2. Udržitelnost aktivity b**

Plán udržitelnost aktivity b) je součástí výše uvedené CBA analýzy. V období udržitelnosti bude nutné zastarávající technologie modernizovat. K tomuto účelu budou využity výše uvedené zdroje.

## **9.3. Plán vývoje výsledků a výstupů projektu v době udržitelnosti**

Jak je uvedeno v tabulce 9.1, plán v průběhu udržitelnosti projektu v letech 2023-2027 je veden logikou zachování udržitelnosti výkonnosti centra i po skončení projektu centra excelentního výzkumu. Uvedené FTE kapacity i výsledky v podobě vědeckých publikací a patentů jsou předpokládány ve výši odpovídající průměrné výkonnosti centra v průběhu řešení. Takové nastavení hodnot vychází z jednoduché úvahy, tj. že výkonost celého centra je nastavena ve výši odpovídající mezinárodním standardům a proto je dobrý předpoklad, že vědecké komunita bude i dále mít zájem rozvíjet multidisciplinární tematiku tohoto centra. Udržení a další návazné rozšíření aktivit navrhovaného centra i po jeho ukončení je jednou z hlavních vlastností navrhovaného centra. Jak navrhovatel, tak partnerská centra mají dlouhou tradici špičkového výzkumu a tato je více než dobrou zárukou budoucí udržitelnosti podpořených výzkumných aktivit. CBA analýza uvádí i představu pro delší časové období (2028-2032).

**Tabulka 9.1. Plán vývoje výsledků a výstupů projektu v době udržitelnosti, tj. v období let 2023-2027.**

Kód a název indikátoru		Cílová hodnota realizace projektu	Vývoj v období udržitelnosti				
			1. rok	2. rok	3. rok	4. rok	5. rok
Výstup	CO 25 Počet výzkumných pracovníků, kteří pracují v modernizovaných výzkumných infrastrukturách	190,03	40	38	35	35	35
Výsledek	2 03 12 Počet účastí podpořených výzkumných týmů realizovaných v programech mezinárodní spolupráce	4	1	1	0	1	1
	2 02 11 Odborné publikace (vybrané typy dokumentů) vytvořené podpořenými subjekty	170	40	34	34	34	34
	2 02 16 Odborné publikace (vybrané typy dokumentů) se zahraničním spoluautorstvím vytvořené podpořenými subjekty	85	20	17	17	17	17
	2 20 11 Mezinárodní patentové přihlášky (PCT) vytvořené podpořenými subjekty	2	0	0	1	0	0



## 10. PŘÍLOHY

### Seznam příloh:

**Příloha 1:** Vybraný seznam publikací VaV centra ÚEB AVČR.

**Příloha 2:** Organigram ÚEB s vyznačením zapojení struktur navrhovaného projektu do stávající organizace.

**Příloha 3:** Seznam projektů realizovaných v letech 2014-2015 jednotlivými VaV centry zapojenými do tohoto projektu.

**Příloha 4:** Seznam 10 nejlepších publikací vědeckých pracovníků zapojených VaV center.

**Příloha 5:** Seznam podílů na výuce v akreditovaných programech vysokoškolského vzdělávání pro zapojená VaV centra.

**Příloha 6:** Dopisy zahraničních spolupracovníků a firem vyjadřující připravenost ke spolupráci s navrhovaným centrem excelentního výzkumu.

**Příloha 7:** CV jmenovitě uvedených seniorských vědeckých pracovníků výzkumného týmu projektu.

**Příloha 8:** Detailní rozpočet projektu, dle rozpočtových kapitol v jednotlivých letech realizace projektu.

**Příloha 9:** Komentář k rozpočtu

**Příloha 10:** Cenové nabídky pořizovaného investičního vybavení (přístroje, software).