

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



Fenotypová analýza transgenních linií tabáku jako nástroj studia genové funkce

Miroslav Srba

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Shrnutí disertační práce

Praha 2015

Poděkování

Na prvním místě děkuji školiteli, RNDr. Lukášovi Fischerovi, Ph.D., za vstřícné a konstruktivní vedení práce a řešených projektů. Dále děkuji Mgr. Josefu Šonkovi za svědomitou a zodpovědnou kolegiální pomoc při řešení projektů zaměřených na studium heterotrimerních G-proteinů. Celému týmu Katedry experimentální biologie rostlin PřF UK a zejména pak laboratoři buněčné biologie a biotechnologie rostlin děkuji za vytvoření vzácně přátelského a tvůrčího prostředí.

Dále děkuji celé své rodině a zejména pak své manželce Stáně za lidskou podporu, bez níž by dosažení vzdálených cílů nebylo možné.

Grantová podpora práce a řešených projektů:

Univerzita Karlova v Praze:

- GAUK 136510
- SVV 265203/2012

Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy:

- MSM 0021620858
- NPUI L01417

Obsah

Poděkování.....	2
Seznam zkratk.....	4
1. Úvod.....	5
2. Cíle.....	7
3. Výsledky a diskuse	8
3.1. Metody fenotypové charakterizace buněčných linií tabáku.....	8
3.1.1. Stanovení základních cytologických parametrů	8
3.1.2. Stanovení denzity suspenzní kultury.....	8
3.1.3. Měření délky a šířky buněk.....	9
3.1.4. Výpočet druhotných popisných veličin.....	11
3.1.5. Kalkulace biomasy	11
3.1.6. Stanovení růstové křivky – matematický odhad	12
3.1.7 Stanovení doby buněčného cyklu a trvání mitózy	14
3.2. Studium vlivu zvýšené exprese <i>HyPRP</i> genů jako modelová situace analýzy fenotypové variability.	14
3.3. Studium heterotrimerních G-proteinů.....	16
3.4. Obecná doporučení pro hodnocení fenotypu transgenních linií odvozených od linie BY-2.....	19
4. Závěry:.....	21
5. Seznam literatury	23
6. Publikace a prezentace výsledků	25
Články v odborných časopisech:.....	25
Prohlášení o autorském podílu na předkládaných publikacích.....	25
Další prezentace výsledků:.....	26

Seznam zkratek

ANOVA	- analýza rozptylu
DB	- délka buněk
GFP	- zelený fluorescenční protein
HyPRP	- hybridní prolinem bohatý protein
MI	- mitotický index
PCD	- programovaná buněčná smrt
SBI	- subkultivační interval
VIA	- viabilita

1. Úvod

Buněčné linie kultivované *in-vitro* mají zásadní význam v buněčné biologii živočichů i rostlin. První rostlinné linie byly izolovány např. z tabáku (*Nicotiana tabacum*), sóji (*Glycine max*), topolu (*Populus* sp.), javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*) a některých dalších rostlin již v 60. letech 20. století (přehled viz Nagata 1992, Opatrný *et al.* 2014). Z hlediska biologického a biochemického výzkumu vykazují buněčné linie některé zásadní přednosti oproti jiným modelovým systémům:

- Buňky rostou izolovaně, popřípadě v jednoduchých shlucích, řetězcích nebo jednobuněčných vrstvách. Dávají tak možnost detailní mikroskopické analýzy v nepoškozeném stavu v porovnání s histologickými řezy, jejichž buňky bývají zásadním způsobem ovlivněny mechanicky a často i fixáží.
- Buňky jsou přímo přístupné experimentálnímu ošetření libovolnými látkami. Tato vlastnost je naprosto klíčová například ve farmaceutickém výzkumu, jelikož velké množství látek není do cílových tkání či pletiv propuštěno, případně jsou tyto látky organismem metabolizovány. *In-vitro* kultivované buněčné linie nejsou bariérami celistvého organismu chráněny a reagují na experimentální ošetření přímo. Jejich reakce navíc není maskována fyziologickým prostředím celistvého organismu. Vzhledem k těmto faktům je však systém buněčných linií do určité míry vzdálený fyziologickým podmínkám (artificiální). To klade zvýšené nároky na správné formulování pracovních hypotéz a adekvátní interpretaci získaných experimentálních dat.
- Experimentálně zavedené modelové linie vykazují vysokou rychlost buněčného dělení. Dostupnost velkého množství buněk v krátkém časovém úseku umožňuje pořizování velkých souborů experimentálních dat a relativně rychlé opakování experimentů, které jinak může být u mnohobuněčných organismů limitováno jejich generační dobou a tedy přípravou pokusných jedinců.
- Nejlépe zavedené modely jako např. živočišné HeLa buňky nebo tabákové linie VBI-0 a BY-2 mohou být navíc efektivně fyziologicky synchronizovány a to dokonce až na úrovni jednotlivých fází buněčného cyklu. To významně rozšiřuje

možnosti analýzy buněčných pochodů a genové exprese v nejrůznějších kontextech.

- Některé z modelových buněčných linií jsou snadno přístupné tranzientní případně též stabilní transformací. Uměle navozená exprese vnesených genů nebo naopak cílené umlčování interních genů (zpravidla prostřednictvím RNA interference; RNAi) má zásadní význam pro popis genové funkce, určení buněčné lokalizace studovaných proteinů a může mít rovněž i biotechnologické využití.

Neustále se zvyšující dostupnost genomických, transkriptomických a proteomických dat s sebou nese poptávku po zjištění mechanismů regulace exprese genů a objasnění funkce jimi kódovaných proteinů. Zároveň komplexita současných biologických znalostí zvyšuje nároky na přesnou kvantifikaci pozorovaných dějů a též jejich ověření. Ačkoliv stěžejní cytologické přístupy byly známy již v době odvození linií jako HeLa (1951) nebo BY-2 (1972), teprve nyní s odstupem několika desetiletí jsou publikovány podrobné manuály, které poskytují návody, jak s dříve zavedenými modely pracovat v kontextu vysokých požadavků současné biologie. Pro plnohodnotnou interpretaci získaných dat je v současné době nezbytná přesná kvantifikace pozorovaných dějů (dynamiky genové exprese, buněčné morfogeneze, apod.), správně stanovená frekvence pozorovaných dějů (viabilita vs. mortalita, internalizace váčků, apod.), a také statisticky ověřená spolehlivost získaných výsledků.

Souhrnným cílem práce je optimalizace technik fenotypového hodnocení transgenních linií odvozených z buněčné linie tabáku BY-2 s přihlédnutím k míře a zdrojům vnitřní variability tohoto modelového systému. Prezentované postupy byly zavedeny a ověřeny na modelovém systému buněčné linie tabáku v rámci dvou samostatných molekulárně biologických projektů, studia funkce hybridních prolinem bohatých proteinů a signalizační role heterotrimerních G-proteinů. Vybrané výsledky těchto projektů vztahující se k hodnocení linií či poznání jejich fyziologie jsou rovněž prezentovány.

2. Cíle

- Optimalizace fenotypového hodnocení linií odvozených od buněčné linie tabáku BY-2
- Aplikace a ověření zavedených postupů při charakterizaci transgenních buněčných linií tabáku
 - příprava a charakterizace linií exprimujících geny kódující hybridní prolinem bohaté proteiny
 - příprava a charakterizace linií exprimujících geny pro regulátor G-proteinové signalizace NtRGS1 a jeho zkrácené varianty

3. Výsledky a diskuse

3.1. Metody fenotypové charakterizace buněčných linií tabáku

3.1.1. Stanovení základních cytologických parametrů

Vzhledem k jednobuněčné až „několikabuněčné“ povaze tabákové linie BY-2 lze fenotyp individuí, tj. buněk nebo jednoduchých buněčných řetízků popisovat zavedenými cytologickými metodami (Nagata *et al.* 1992, Richard *et al.* 2001). V porovnání se suspenzemi kvasinek nebo krevních buněk je však třeba některé techniky do určité míry adaptovat, aby bylo možné dosáhnout požadované přesnosti měření a srovnatelné efektivity zpracování vzorků jako u buněčných typů, pro které byly metody původně optimalizovány (Seifertová *et al.* 2014).

Mezi primární parametry, kterými lze fenotyp buněčných linií odvozených od linie BY-2 popisovat patří: viabilita, mitotický index, rozměry buněk, tj. délka a šířka, denzita buněčné suspenze (tj. množství buněk v jednotce objemu kultivačního média)

Stanovení viability a mitotického indexu lze u buněk linie BY-2 provádět zcela standardními metodami, které byly shrnuty např. v pracích Nagata *et al.* (1992), Seifertová *et al.* (2014), Srba *et al.* (v tisku)

3.1.2. Stanovení denzity suspenzní kultury

Stanovení denzity, tj. počtu buněk v jednotce kultivačního média je v případě linie BY-2 komplikováno především rozměry buněk a jejich řetízků. Standardní počítací komůrky užívané v mikrobiologii a hematologii jsou dimenzovány pro stanovení přibližně isodiametrických částic, které jsou v optimálním případě menší, než je polovina výšky počítací komůrky (Kouri *et al.* 2003), což je u nejčastěji užívaných modelů 100 μm (Bürker, Neubauer, Thoma) nebo 200 μm (Fuchs-Rosenthal). Buňky tabákové linie BY-2 však například ve stacionární fázi dosahují délky přibližně 80 μm a bývají spojené do vícebuněčných řetízků, jejichž délka dosahuje stovek μm a může přesáhnout i jeden milimetr. Značné rozměry buněčných řetízků vedoucí k nesourodé struktuře buněčné suspenze BY-2 lze z pohledu stanovení

buněčné denzity řešit technikami macerace (Johansen 1940, Brown & Rickless 1949, Richard *et al.* 2001). Tyto však zvyšují nároky na přípravu vzorků a především jsou poměrně destruktivní, tzn. znemožňují stanovení dalších cytologických parametrů na jednom vzorku, popř. ze společných obrazových dat.

Z tohoto důvodu byl pro účely stanovení denzity buněčné linie BY-2 adaptován protokol použití počítačí komůrky Fuchs-Rosenthal, který je založen na definované aplikaci vzorků do sčítacího prostoru komůrky. Následné hodnocení počítá s rutinní fotodokumentací komůrek snímacím zařízením mikroskopu a časově odloženým a do značné míry automatizovaným pořízením numerických dat pomocí softwaru obrazové analýzy. Detaily protokolu byly popsány v práci Srba *et al.* (v tisku).

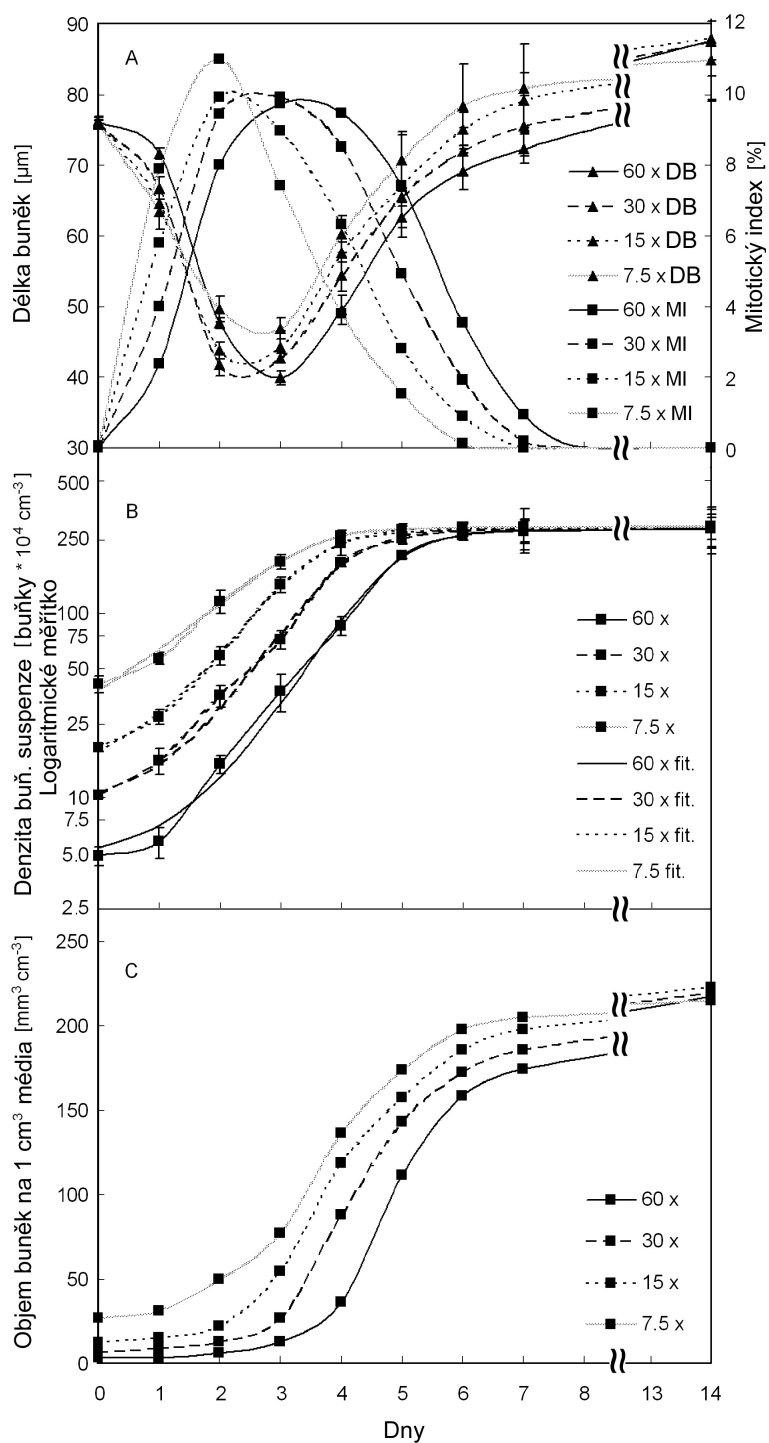
3.1.3. Měření délky a šířky buněk

Délka buněk je jedním ze základních znaků, kterým lze charakterizovat morfologii buněk BY-2. Jedná se o velmi variabilní parametr, který se cyklicky mění během subkultivačního intervalu a na nějž působí dva protichůdné procesy. Dělení buněk a jejich elongace (obr. 1A). Případné naměřené změny v délce buněk mezi experimentálními variantami proto mohou být odrazem ovlivnění jak dělivé aktivity buněk, tak změnami v dynamice buněčné elongace.

V práci Srba *et al.* (v tisku) byla demonstrována dynamika změn buněčné délky v kontextu dělivé aktivity standardně kultivované linie BY-2 v závislosti na velikosti inokula. Práce rovněž popisuje optimalizovanou metodiku měření délky buněk a vhodné přístupy statistického zpracování dat, které v případě tohoto parametru nevykazují normální rozložení (buňky jsou zřídka kdy kratší než 30 μm , mohou však dosahovat vysokých odlehlých hodnot) a zároveň vykazují určitou míru vnitřní závislosti danou fyziologickou synchronizací buněk v rámci buněčných řetízků (Laporte *et al.* 2003, Campanoni *et al.* 2003, Maisch a Nick 2007).

Šířku buněk lze stanovovat obdobnými metodami obrazové analýzy. Tento parametr je však v porovnání s délkou buněk zpravidla velmi konstantní, zejména pak u kultur, které prošly klonováním, viz kapitola 3.2. Vzhledem k tomu, že data

popisující šířku buněk vykazují normální rozložení, lze je bez problémů srovnávat analýzou rozptylu (ANOVA), popřípadě párově parametrickým t-testem.



Obr. 1: Změny vybraných parametrů v průběhu subkultivačního intervalu u standardně kultivované linie BY-2. Čtyři varianty lišící se výchozím ředěním při inokulaci. A) Mitotický index a délka buněk. B) Denzita buněčné suspenze. C) Vypočtená biomasa (výpočet na základě známé velikosti buněk a jejich denzity).

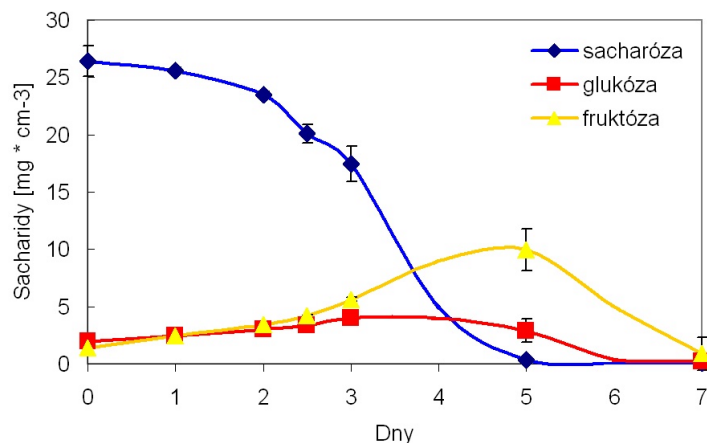
3.1.4. Výpočet druhotných popisných veličin

Druhotnou popisnou veličinou můžeme rozumět parametr charakterizující studovanou buněčnou linii, který byl získán výpočtem z parametrů primárních. Příkladem může být stanovení růstové křivky, výpočet doby buněčného cyklu nebo též stanovení čerstvé biomasy, kterou lze u obvyklých rostlinných vzorků snadno stanovit vážením, ale v případě linie BY-2 je takový přístup metodicky komplikovaný a spolehlivějších výsledků bylo dosaženo matematickým výpočtem tohoto parametru.

3.1.5. Kalkulace biomasy

Stanovení čerstvé biomasy buněk linie BY-2 je značně komplikováno obtížnou standardizací separace vlastní biomasy buněk od kultivačního média. Sedimentace buněk nebo základní filtrace zanechává ve vzorcích nedefinované reziduum média, naopak vakuová filtrace odsaje z části buněk i jejich vnitřní obsah, díky čemuž není následně možné stanovit hmotnost biomasy studovaného vzorku.

Jako alternativní přístup se proto jeví možnost spočítat objem buněk v suspenzi ze znalosti jejich rozměrů a denzity. Takto kalkulované křivky představuje obrázek 1C. Je zde patrný dramatický nárůst vypočtené biomasy cca uprostřed subkultivačního intervalu, který je daný synergickým efektem vysoké mitotické aktivity měřené kultury a počínající fází elongace buněk. Tuto dramatickou změnu lze pozorovat i makroskopicky, kdy kultura téměř během jediného dne změní svoji konzistenci z řídké, průsvitné suspenze na hustou kašovitou hmotu. Lze proto usuzovat, že vypočtený průběh reálně odráží růstovou dynamiku suspenze buněk BY-2 a nejedná se o efekt násobení technické chyby při měření dvou výchozích veličin. Navíc lze uvažovat o možném vztahu s dynamikou metabolizace cukrů v médiu, kdy mezi 3. a 5. dnem má kultura k dispozici největší množství dostupných hexóz viz obr. 2, které jsou buňkami linie BY-2 přednostně metabolizovány (Hartig a Beck 2006).



Obr. 2: Koncentrace sacharidů v kultivačním médiu standardně kultivované linie BY-2 během subkultivačního intervalu (Srba a Lipavská nepublikované výsledky).

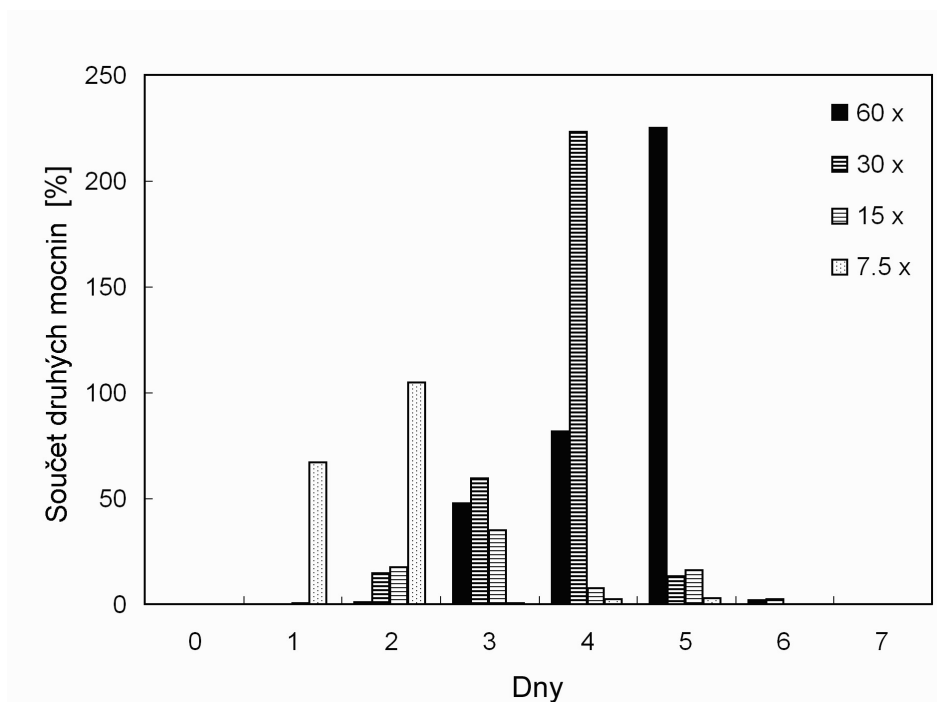
3.1.6. Stanovení růstové křivky – matematický odhad

Primární data stanovení denzity buněčných suspenzí s pomocí počítačích komůrek vykazují poměrně vysokou variabilitu. I s použitím optimalizovaného postupu je průměrný variační koeficient těchto dat 23 % (Srba *et al.* v tisku). Rekonstrukce růstové křivky plným pokrytím primárními daty denzity suspenzí je proto mimořádně pracné. Jednotlivé údaje o denzitě suspenzí navíc zpravidla nejsou cílem experimentálního srovnávání. Větší výpovědní hodnotu pro popis růstové dynamiky suspenzí má celkový průběh růstové křivky, popřípadě sklon její exponenciální fáze a z něj odvoditelná délka buněčného cyklu. Nabízí se proto možnost redukovat vzorkování růstové křivky v průběhu SBI a celou růstovou křivku matematicky odhadnout proložením logistické křivky (tzv. „data fitting“).

Proložení logistické křivky pořizovanými daty má některé kritické body. Prvním z nich je počáteční fáze růstu, resp. „zakořenění křivky“. To je dáno krátkou dobou lag-fáze zdravě rostoucích kultur, která je při typickém vzorkování 1 den popsána nedostatečným množstvím dat. Tento problém lze odstranit hustějším vzorkováním počáteční fáze růstu (např. po 8 nebo 12 hodinách), pokud je tato dynamika předmětem experimentálního zájmu. Alternativou je nastavení mantinelů (hraničních hodnot) pro odhad průběhu křivky v bodu 0. Jako velmi efektivní a z biologického

hlediska též korektní se ukázalo použití intervalu spolehlivosti primárních dat popisujících denzitu v bodě 0 (Srba *et al.* v tisku).

Obrázek 1B srovnává průběh růstových křivek rozdílně řaděných variant buněčné linie BY-2. Pro srovnání jsou též zařazeny logistické křivky odhadnuté dle postupu publikovaného v práci Srba *et al.* (v tisku). Vzhledem k tomu, že cílem prokládání naměřených dat logistickou křivkou je redukce manuální experimentální práce, byla kombinatoricky testována významnost jednotlivých měření pro správnost matematického odhadu průběhu křivky. Pro výpočet byla tedy postupně vynechávána jednotlivá měření a následně byla stanovena odchylka vypočtené křivky od křivky reálně naměřené a to metodou sumy druhých mocnin odchylek (sum of squares). Tuto relativní důležitost měření v jednotlivých dnech znázorňuje obr. 3. Je zde patrné, že měření např. v 6. dni má pro podobu odhadnuté křivky minimální význam. Naopak měření ve dnech 4 a 5, kdy kultura zpravidla opouští fázi exponenciálního růstu a přechází do fáze stacionární, se zdají být pro adekvátní odhad tvaru křivky klíčová.



Obr. 3: Relativní důležitost měření denzity buněčné suspenze v jednotlivých dnech SBI. Čtyři varianty standardně kultivované linie BY-2 lišící se počátečním řaděním při inokulaci. Sloupečky vyjadřují nárůst sumy druhých mocnin odchylky (v každém dnu) mezi křivkou sestavenou ze všech dat a mezi vypočtenou křivkou s vynecháním daného dne.

3.1.7 Stanovení doby buněčného cyklu a trvání mitózy

Exponenciální fáze růstu buněčné linie se projevuje při logaritmickém vynesení růstové křivky jako lineární úsek, ve kterém se prakticky každá buňka pravidelně dělí v určitém časovém intervalu. Čas (t) zdvojení počtu buněk lze stanovit podle Richarda *et al.* (2001) jako $t = (t_2 - t_1) / \log_2(\text{denzita}_{t_2} / \text{denzita}_{t_1})$. Hodnoty mezi 18,6 a 20,2 vypočtené na základě námi publikovaných dat (Srba *et al.* v tisku) dobře korespondují s prací Nagaty *et al.* (1992).

Ze známé doby buněčného cyklu lze rovněž odhadnout dobu mitózy jako násobek doby trvání buněčného cyklu a mitotického indexu. Doba vypočtená na základě našich dat odpovídá přibližně dvěma hodinám, což je opět v souladu s dříve publikovanými daty (Granger a Cyr 2000).

3.2. Studium vlivu zvýšené exprese *HyPRP* genů jako modelová situace analýzy fenotypové variability.

Vzorová situace fenotypové analýzy byla řešena v rámci projektu zaměřeného na odhalení funkce hybridních prolinem bohatých proteinů buněčné stěny. Jedním z cílů daného projektu byla příprava transgenních linií tabáku exprimujících modifikovaný gen *NtHyPRP1*, z něž byla deletována sekvence kódující prolinem bohatou doménu. Předpokládalo se, že správně lokalizovaný protein bude kompetovat s nativním proteinem o domnělé ligandy a vzhledem k absenci jedné z domén tak v buňkách naruší přirozenou funkci proteinu.

Buněčná linie tabáku BY-2 vykazuje v porovnání se srovnatelnými modely nejvyšší fyziologickou i morfologickou homogenitu. Přesto však zbývající variabilita buněk není nulová a může maskovat změny navozené experimentálním ošetřením nebo transgenozí. Z tohoto důvodu se ukázalo jako klíčové stanovení vnitřní variability systému (kontrolních linií, která byla dále srovnávána s variabilitou testovaných linií).

Práce Dvořákové *et al.* (2012) dokumentuje význam dvou stupňů kontrol – čerstvě roztřepané kalusy výchozí linie BY-2, které odrážejí variabilitu vzniklou

přechodem kalus ↔ suspenzní kultura a dále kontrolou efektu samotné transformace, v tomto případě linie exprimující gen pro cytoplasmaticky lokalizované GFP, které by nemělo působit změny fenotypu (Seth *et al.* 1998, Stewart 2001). Lze však též doporučit transformaci „prázdným“ binárním vektorem.

Při srovnání fenotypu suspenzí výchozí linie BY-2, linií exprimujících *GFP* a linií exprimujících modifikovaný gen *NtHyPRP1* bylo prokázáno mnoho statisticky významných rozdílů v rámci kontrolní skupiny i v rámci testované skupiny HyPRP. Podstatné však bylo zjištění, že populace transformantů měla rozptýl hodnot průměrné délky buněk oproti kontrolám statisticky významně posunutý (Dvořáková *et al.* 2012). Analýza hladiny exprese vneseného modifikovaného genu *NtHPRP1* překvapivě ukázala, že pozorovaný fenotypový projev neodpovídal stanovené míře exprese. Těsnější vztah byl však pozorován mezi součtem exprese vneseného genu + exprese genu interního a mezi pozorovaným fenotypem. Linie, které zřejmě druhotně snížily expresi interní nemodifikované verze genu, se tak fenotypově blížily liniím kontrolním. Dané pozorování proto může být příkladem kompenzačních mechanismů, jež je třeba brát při hodnocení transgenních linií v úvahu.

Druhým příkladem hodnocení fenotypových rozdílů může být hodnocení šířky buněk, které bylo v rámci stejného projektu rovněž provedeno, a to stejným způsobem jako hodnocení šířky buněk popsané výše. I zde byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými liniemi. Dané rozdíly vznikly zřejmě „klonovacím efektem“ transformačního procesu, kdy se z původní buněčné populace vyštěpily klony s různou buněčnou šířkou, kterou si nadále poměrně uniformně zachovávaly. Tento fenomén je poměrně biologicky zajímavý, jelikož může souviset s morfologickou pamětí buněk danou vztahem kortikálního mikrotubulového cytoskeletu a mikrofibril primární buněčné stěny (Paredes *et al.* 2006), a rovněž může být zajímavým modelem pro studium orientace buněčného růstu (Pena a Heinlein 2013, Ambrose a Wasteneys 2014). Vzhledem k tomu, že se rozptýl průměrných hodnot buněčné šířky statisticky významně nelišil mezi kontrolní a testovanou HyPRP skupinou, lze pozorované rozdíly hodnotit z hlediska funkce proteinů rodiny HyPRP jako irelevantní.

3.3. Studium heterotrimerních G-proteinů

Vedle dobře známé možnosti synchronizace ve fázi buněčného cyklu (Nagata *et al.* 1992) může být linie BY-2 užitečným modelem i při studiu fyziologie a metabolismu buněk. Během SBI kultura prochází fází exponenciálního buněčného dělení, které může simulovat situaci v aktivním meristému. Následně přechází do fáze stacionární, kdy se buňky prodlužují a mohou tak připomínat buňky dlouhivé zóny kořene popř. stonku. Pokud není kultura po 7 dnech pasážována, začínají buňky vykazovat známky senescence a později odumírají (prostřednictvím programované buněčné smrti). Takto fyziologicky synchronní systém je vhodný pro charakterizaci metabolismu rostlinných buněk v určité fázi vývoje, vč. analýzy exprese řady genů. Z těchto důvodů byla buněčná linie tabáku naším týmem využita pro studium úlohy heterotrimerních G-proteinů v regulaci dělení rostlinných buněk.

Prvotním úkolem bylo charakterizovat význam jednotlivých domén proteinu RGS1 pro nativní buněčnou lokalizaci proteinu a dále pro endocytózu v reakci na přítomnost cukrů. Protein RGS1 je nejpravděpodobnějším kandidátem na funkci receptoru vázaného na G-proteiny (tzv. GPCR) u rostlin. Část z těchto výsledků již byla publikována (Phan *et al.* 2014).

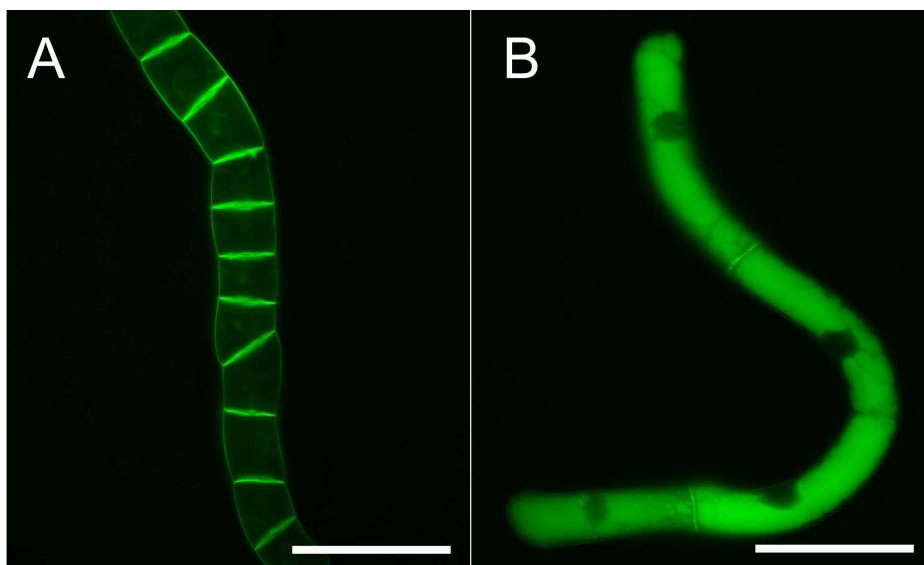
Při analýzách linií transformovaných konstruktem *RGS1::GFP* byly pozorovány cyklické změny v lokalizaci fluorescenčního signálu. Zatímco u exponenciálně se dělících buněk byla pozorována očekávaná lokalizace v plazmatické membráně, ve fázi stacionární tento signál z membrány mizí a masivně se objevuje ve vakuole (obr. 4). Vakuolární lokalizace GFP velmi pravděpodobně souvisí s autofagickou degradací fúzního proteinu RGS1:GFP a může být interpretována jako nespecifická reakce na stres (Toyooka *et al.* 2006). V případě stacionárních buněk linie BY-2 lze předpokládat stres způsobený vyčerpáním některých živin. Pro lepší pochopení fyziologie a metabolismu linie BY-2 a optimální nastavení prováděných experimentů bylo vhodné identifikovat podmínky, které jsou za pozorované změny zodpovědné. Byly proto vytipovány potencionálně limitující živiny, které byly stacionárním, hladovějícím buňkám externě dodány do vyčerpaného média ve formě a množství v jakém jsou dostupné ve standardním kultivačním médiu. Těmito živinami byl dusík (dodán jako NH_4NO_3), cukry (testována jak sacharóza, tak glukóza) a fosfor (dodán

jako K_2HPO_4), u něž je literárně publikováno, že je při standardním kultivačním protokolu limitujícím faktorem růstu buněk linie BY-2 (Nagata *et al.* 1992). Stacionární kultura exprimující *RGS1:GFP* byla filtrována, vyčerpané médium bylo obohaceno vždy jednou z uvedených živin a do upraveného média byly nasazeny (vráceny) vzorky buněk odpovídající přibližně 10 % denzity stacionární suspenze resp. denzité 2. až 3. dne SBI s cílem umožnit obnovení dělivé aktivity buněk. Nejmarkantnější reakce spojená s návratem signálu *RGS1:GFP* do plasmatické membrány a obnovením dělivé aktivity byla pozorována u aplikace cukrů a fosforu. Aplikace dusíku naopak tuto obnovu inhibovala. Překvapivým zjištěním bylo, že k částečné relokaci signálu do membrány a náznakům mitotické aktivity ($MI < 2\%$) došlo též u kontroly, kde došlo pouze k naředění stacionárních buněk ve vyčerpaném médiu (Šonka a Srba nepublikované výsledky). Z toho lze vyvozovat, že stacionární, plně narostlá kultura buněčné linie BY-2 není stresována jen absencí některých živin (např. cukry nebo fosfor), ale také nedostatkem kyslíku (hypoxie). Cyklická relokace, pravděpodobně spojená s degradací *RGS1:GFP* by mohla ukazovat na možnost, že systém heterotrimerních G-proteinů je nějakým způsobem zapojen do reakcí rostlin na stres, což naznačují i některé dřívější publikace (Heo *et al.* 2012). Za pravděpodobnější vysvětlení přesunu fluorescenčního signálu *RGS1:GFP* do vakuoly však lze považovat nescifickou reakci na stres spojenou s autofagií (Toyooka *et al.* 2006).

Zjištění, že je možné u hladovějících buněk obnovit nativní lokalizaci *RGS1:GFP* v plasmatické membráně pouhým zředěním a dodáním K_2HPO_4 bylo klíčové pro další experimentální práci při studiu úlohy *RGS1* v cukerné signalizaci. Podařilo se tak nalézt podmínky, kdy se cukerně vyhladovělé buňky nacházejí v prostředí zcela bez cukrů a zároveň vykazují nativní lokalizaci fluorescenčně značeného *RGS1* (Šonka a Srba nepublikované výsledky). Toto uspořádání umožňuje sledovat reakci buněk (změny lokalizace *RGS1*) po definované aplikaci vybraných cukrů.

Prvotní charakterizace linií exprimujících $G\alpha$ podjednotku heterotrimerního G-proteinového komplexu naznačila možné změny v růstové dynamice těchto linií a dále pak změny v příjmu cukrů. Aby bylo možné dát pozorované změny v růstu do

kontextu s příjmem cukrů, byla provedena nejdříve analýza průběhu metabolizace 3% sacharózy standardní, netransformovanou linií BY-2. Výsledky ukázaly, že sacharóza je kulturou nejdříve hydrolyzována na glukózu a fruktózu, načež je přednostně spotřebována glukóza, následně fruktóza až se hladina sacharidů v médiu ke konci SBI přiblíží úplné nule, viz obr. 2 (Srba a Lipavská nepublikované výsledky, Hartig a Beck 2006). Tento systém, ve kterém se každým dnem mění koncentrace a proporce tří sacharidů je pro experimentální práci příliš složitý. Takto komplexní situaci lze jen nejasně ovlivňovat a především interpretace získaných výsledků by byla velmi obtížná (Hartig a Beck 2006). Proto bylo přistoupeno k pilotnímu zjednodušení tohoto modelu a linie BY-2 (jak kontrolní, tak transgenní) byly experimentálně zásobovány 1,5% glukózou namísto 3% sacharózy (zachování osmolarity prostředí). Reakce kultur byly překvapivě velmi příznivé – růst linií byl téměř normální. Byla pozorována pouze nepatrně nižší denzita na konci SBI. Nápadnější odchylky od standardně kultivovaných buněčných linií byly pozorovány až v pozdějších fázích senescence - od 10. dne od nasazení, např. nestandardní lokalizace jader v rámci buněčných řetízků (Šonka a Srba nepublikované výsledky). Takto zjednodušený systém již bude možné lépe využít pro měření příjmu cukrů buňkami, vč. následného měření obsahu rozpustných cukrů nebo akumulovaného škrobu uvnitř buněk. Naměřené hodnoty bude možné dávat do kontextu s fenotypovými projevy transgenních linií se zvýšenou expresí genů pro složky heterotrimerního G-proteinového komplexu, především pak *RGS1* a *GPA1* (=G α).



Obr. 6: Buněčná linie tabáku exprimující *RGSI:GFP*. A) Exponenciální kultura s proteinem lokalizovaným v plazmetické membráně. B) Stacionární kultura s fluorescenčním signálem ve vakuole. Měřítko 100 μm .

3.4. Obecná doporučení pro hodnocení fenotypu transgenních linií odvozených od linie BY-2

Celkové metodické přístupy optimalizující hodnocení fenotypu buněčných linií tabáku byla shrnuta v publikaci Srba *et al.* (v tisku).

Mezi hlavní diskutované přístupy lze zařadit nutnost maximálního možného ředění suspenzních kultur při subkultivaci. Tento faktor bez dalších detailů zmiňuje již Nagata a Kumagai (1999) jako klíčový pro dostatečnou efektivitu synchronizace buněčného dělení aplikací aphidicolinu. Výsledky prezentované v práci Srba *et al.* (v tisku) ukázaly další pozitivní efekty vysokého ředění buněk. Dlouhý časový úsek exponenciálního dělení pomáhá přesnější kalkulaci parametrů, jako je doba buněčného cyklu. Jak bylo popsáno v kapitole 3.1.3. elongace a dělení buněk jsou dva děje, které protichůdně působí na buněčnou morfologii. Kultura, která je maximálním způsobem zředěna setrvává ve fázi exponenciálního dělení až čtyři dny ze sedmi dnů SBI. Během

této doby dosáhne naprostá většina buněk minimální fyziologické délky, která je u výchozí buněčné linie BY-2 přibližně 30 μm . Po vyčerpání limitujících živin v médiu se takto morfologicky unifikované buňky začnou prodlužovat, čímž se zvýší morfologická uniformita i ve stacionární fázi. Snížená variabilita parametrů buněk dovoluje pořizování menších datových souborů při zachování jejich výpovědní hodnoty a statistické významnosti prováděných testů.

S ohledem na plánování pokusů lze doporučit maximální zefektivnění postupů pořizování primárních popisných parametrů. Čas a pracovní nasazení ušetřené při hodnocení vzorků je možné využít pro zařazení většího množství individuálních transgenních linií nebo jiných variant či opakování do experimentálního uspořádání. To lze považovat za klíčové pro důvěryhodné odlišení relevantních fenotypových projevů od vnitřní, rozmanitě generované variability modelového systému, jež byla diskutována výše.

V tomto směru lze velmi doporučit časově odložené provádění cytologické analýzy, které počítá s přípravou vzorků a jejich fotodokumentací v prvním kroku. Odečítání číselných hodnot může být pak prováděno s větším časovým odstupem z obrazových dat, často automaticky nebo poloautomaticky použitím softwaru obrazové analýzy. V určitých případech lze rovněž pořizovat víceúčelové snímky, na nichž lze hodnotit více parametrů, např. rozměry buněk, mitotický index a zároveň stanovit denzitu analyzované suspenze. Časové oddělení fotodokumentace a cytologického hodnocení umožňuje zpracování většího množství vzorků v dostupném časovém úseku. Zároveň redukuje čas mezi zpracováním jednotlivých vzorků, které mohou mimo kultivační zázemí podléhat nežádoucím změnám, které by mohly ovlivnit finální výstupy.

4. Závěry:

- Fenotypové projevy buněčné linie BY-2 a z ní odvozených transgenních linií lze popisovat řadou cytologických znaků. Mezi základní parametry patří viabilita, mitotický index nebo rozměry buněk. Přímé stanovení biomasy a jejího nárůstu je problematické. Bylo však ukázáno, že tento základní parametr lze věrohodně spočítat ze znalosti rozměrů buněk a aktuální denzity buněčné suspenze. U dobře synchronních linií lze výpočtem stanovit některé další sekundární parametry jako je doba trvání buněčného cyklu či mitózy.
- Pro charakterizaci fenotypu transgenních linií je klíčové přesné stanovení variability kontrolních linií. Kontrolami je doporučeno simulovat i přechod z kalusové podoby do suspenzní kultury. Do experimentálního uspořádání je nezbytné zařadit transgenní linie transformované prázdným vektorem nebo reportérovým genem (např. *GFP*; Seth *et al.* 1998) s neutrálním fenotypovým projevem pro srovnání vlivu samotné transformace na fenotypovou variabilitu studovaných linií. Metody fenotypového hodnocení buněčných linií je vhodné maximálně zefektivnit, aby bylo možné do experimentálních modelů zařadit co nejvíce nezávisle transformovaných linií. Je to základní předpoklad spolehlivého odlišení relevantních fenotypových projevů od náhodných a těžko interpretovatelných změn.
- Morfologickou i fyziologickou variabilitu buněk testovaných linií lze snižovat maximálním ředěním buněčných suspenzí při subkultivaci. Tento efekt byl již dříve publikován (Nagata a Kumagai 1999), v aktuální práci je však blíže charakterizován vliv vysokého ředění na fyziologickou synchronizaci buněk. Rovněž je dokladován pozitivní význam maximálně uniformních a fyziologicky synchronních linií pro stanovování některých parametrů (např. délka buněčného cyklu).
- Při studiu fenotypových projevů zvýšené exprese genu pro hybridní prolinem bohatý protein NtHyPRP1 byla prokázána nadměrná elongace transgenních linií v porovnání s kontrolami. Modelová situace rovněž

ukázala na možnost maskování projevů modulované exprese genu zpětnovazebným snížením exprese interních genů téže rodiny.

- Při charakterizaci transgenních linií exprimujících geny pro proteiny RGS1 a jeho zkrácené varianty fúzované s GFP byl potvrzen význam C-terminální domény tohoto proteinu pro jeho schopnost vytvářet váčky v reakci na zvýšení extracelulární koncentrace glukózy. Pro další studium významu heterotrimerních G-proteinů v cukerné signalizaci a regulaci buněčné proliferace byl modifikován kultivační postup linií BY-2 - sacharóza byla nahrazena glukózou, čímž bylo zjednodušeno heterogenní „cukerné prostředí“ spojené s pozvolným štěpením sacharózy a následnou nerovnoměrnou utilizací hexóz. Suspenzní kultury se tak staly efektivním, fyziologicky synchronním modelem pro studium vlivu jednotlivých komponent heterotrimerního G-proteinového systému na metabolismus cukrů a regulaci buněčného dělení.

5. Seznam literatury

Ambrose C., Wasteneys G. O.: Microtubule initiation from the nuclear surface controls cortical microtubule growth polarity and orientation in *Arabidopsis thaliana*. - *Plant and Cell Physiology*, **55(9)**: 1636-1645, 2014.

Brown R., Rickless P.: A new method for the study of cell division and cell extension with some preliminary observations on the effect of temperature and of nutrients. - *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences* **136(882)**: 110-125, 1949.

Campanoni P., Blasius B., Nick P.: Auxin transport synchronizes the pattern of cell division in tobacco cell line. - *Plant Physiology* **133**: 1251-1260, 2003.

Dvořáková L., Srba M., Opatrný Z., Fischer L.: Hybrid proline-rich proteins: novel players in plant cell elongation? - *Annals of Botany* **109(2)**: 453-462, 2012.

Granger C.L., Cyr R.J.: Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. - *Planta* **210(3)**: 502-509, 2000.

Hartig K., Beck E.: Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. - *Plant Biology*, **8(3)**: 389-396, 2006.

Heo J. B., Sung S., Assmann S. M.: Ca²⁺-dependent GTPase, extra-large G protein 2 (XLG2), promotes activation of DNA-binding protein related to vernalization 1 (RTV1), leading to activation of floral integrator genes and early flowering in *Arabidopsis*. - *Journal of Biological Chemistry*, **287(11)**: 8242-8253, 2012.

Johansen D.A.: *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York. 523 pp., 1940. Kouri T., Gyory A., Rowan R.M.: ISLH Recommended Reference Procedure for the Enumeration of Particles in Urine. - *Laboratory Hematology* **9**: 58-63, 2003.

Kouri T., Gyory A., Rowan R.M.: ISLH Recommended Reference Procedure for the Enumeration of Particles in Urine. - *Laboratory Hematology* **9**: 58-63, 2003.

Laporte C., Vetter G., Loudes A.M., Robinson D.G., Hillmer S., Stussi-Garaud C., Ritzenthaler C.: Involvement of the Secretory Pathway and the Cytoskeleton in Intracellular Targeting and Tubule Assembly of Grapevine fanleaf virus Movement Protein in Tobacco BY-2 Cells. - *The Plant Cell* **15**: 2058-2078, 2003.

Maisch J., Nick P.: Actin Is Involved in Auxin-Dependent Patterning. - *Plant Physiology* **143**: 1695-1704, 2007.

Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S.: Tobacco BY-2 cell line as the 'HeLa' cells in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* **132**: 1-30, 1992.

Nagata T., Kumagai T.: Plant Cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. - *Methods in Plant Science* **21**: 123-127, 1999.

Opatrný Z., Nick P., Petrášek J.: Plant Cell Strains in Fundamental Research and Applications. – In: Nick P., Opatrný Z. (ed.): *Applied Plant Cell Biology, Plant Cell Monographs Volume 22*. Pp. 455-481. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 2014

Paredes A. R., Somerville C. R., Ehrhardt D. W.: Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. - *Science* **312(5779)**: 1491-1495, 2006.

Peña E. J., Heinlein M.: Cortical microtubule-associated ER sites: organization centers of cell polarity and communication. - *Current opinion in plant biology*, **16(6)**: 764-773, 2013.

Phan N., Urano D., Srba M., Fischer L., Jones A. Sugar-induced endocytosis of plant 7TM-RGS proteins. - *Plant Signaling & Behavior*, **8(2)**, 2013

Richard C., Granier C., Inzé D., De Veylder L.: Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. - *Journal of experimental botany* **52(361)**: 1625-1633, 2001.

Seifertová D., Klima P., Parezová M., Petršek J., Zazimalová E., Opatrný Z.: Plant cell lines in cell morphogenesis research. - *Plant Cell Morphogenesis, Methods in Molecular Biology* **1080**: 215-229, 2014.

Seth J.D., Vierstra R.D.: Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. - *Plant Molecular Biology* **36**: 521-528, 1998.

Srba M., Černíková A., Opatrný Z., Fischer L.: Practical guidelines for the characterization of BY-2 cell lines. – *Biologia Plantarum* v tisku

Toyooka K., Moriyasu Y., Goto Y., Takeuchi M., Fukuda H., Matsuoka K.: Protein Aggregates are Transported to Vacuoles by a Macroautophagic Mechanism in Nutrient-Starved Plant Cells. - *Autophagy*, **2(2)**: 96-106. 2014.

6. Publikace a prezentace výsledků

Články v odborných časopisech:

- 1) Dvořáková L. *, Srba M. *, Opatrný Z., Fischer L.: Hybrid proline-rich proteins: novel players in plant cell elongation? - *Annals of Botany* 109(2): 453-462, 2012.
- 2) Phan N., Urano D., Srba M., Fischer L., Jones A. Sugar-induced endocytosis of plant 7TM-RGS proteins. - *Plant Signaling & Behavior*, 8(2), (2013)
- 3) Srba M., Černíková A., Opatrný Z., Fischer L.: Practical guidelines for the characterization of BY-2 cell lines. – *Biologia Plantarum* in press

Prohlášení o autorském podílu na předkládaných publikacích

- ad 1) Příprava konstruktů *NtHyPRP1* s deletovanou sekvencí kódující prolinem bohatou doménu. Příprava transgenních linií tabáku exprimujících modifikovaný *NtHyPRP1*. Fenotypová cytologická analýza transgenních linií BY-2. Analýza exprese vneseného i interního genu *NtHyPRP1*. Statistické zpracování biometrických dat. (* Dvořáková a Srba - sdílené první autorství.)
- ad 2) Příprava konstruktů a následně transgenních linií tabáku exprimujících *NtRGS1* a jeho zkrácené varianty fúzované s *GFP*. Cytologická analýza transgenních linií.
- ad 3) Příprava rukopisu. Optimalizace metod. Cytologická analýza buněčných linií tabáku. Základní statistické zpracování biometrických dat. Podíl uvedených spoluautorů byl především konzultační.

Další prezentace výsledků:

Cvrčková F., Binarová P., Srba M., Schwarzerová K., Pokorná J.: Small Actin Rings in Plant Cells: Artifact or Reality? XI. Cytoskeletální klub, Vranovská ves. 2003
Plakátová prezentace

Srba M., Fischer L.: Metody hodnocení přirozené a transgenozí navozené morfologické variability buněčných linií BY-2, klonování transgenních linií BY-2. Konference řešitelů centra základního výzkumu REMOROST, Čejkovice 13.-14.9. 2007. Přednáška

Srba M.: Vývoj aerenchymu v kořenech mokřadních rostlin a metodické přístupy k jeho studiu. Konference řešitelů centra základního výzkumu REMOROST, Křtiny 11.-12.9. 2008. Přednáška

Srba M.: Změny symplastického propojení buněk primární kůry rostoucích kořenů kukuřice a rákosu. Konference řešitelů centra základního výzkumu REMOROST, Poděbrady 14.-15.9. 2009. Přednáška

Srba M., Vášková K., Soukup A.: The symplastic cell interconnection changes during maize and reed root cortex development. 7th. Root Research and Application, Vídeň, 4. 9. 2009, Sborník abstrakt s. 57. Plakátová prezentace

Šonka J., Srba M., Fischer L.: Heterotrimeric G-proteins in plant signaling. Conference on Biotechnology and Biomedicine - 13. 4. 2012 Brno. Přednáška s abstraktem v publikovaném sborníku (ISBN 978-80-210-5811-8; str. 80)