

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



Fenotypová analýza transgenních linií tabáku jako nástroj studia genové funkce

doktorská disertační práce

Miroslav Srba

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

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

Abstrakt

Buněčné linie představují významný modelový systém v buněčné biologii rostlin. Dovolují jednoduché provedení cytologických analýz po nejrůznějších experimentálních ošetřeních vč. ovlivnění exprese studovaných genů. Buněčná linie tabáku BY-2 je významně upřednostňovaný model pro svoji vysokou dělivou aktivitu, schopnost efektivní synchronizace buněčného cyklu a snadnou transformovatelnost. Díky poměrně vysoké uniformitě dovoluje linie BY-2 morfologické hodnocení fenotypu na základě cytologických parametrů jako je mitotický index, viabilita, denzita a další.

Předkládaná práce shrnuje zavedené metody a současné zkušenosti s prací s tabákovou linií BY-2. Jako vzorové případy hodnocení cytologických parametrů a fenotypování na buněčné úrovni jsou přeloženy vybrané výsledky dvou řešených projektů, jež byly zaměřeny na studium hybridních prolinem bohatých proteinů a na studium významu heterotrimerních G-proteinů v regulaci buněčné proliferace. V průběhu řešení těchto projektů byly optimalizovány postupy cytologického hodnocení buněčné linie BY-2. Tyto postupy zefektivňující využití tabákové linie BY-2 ve studiu genové funkce jsou v práci prezentovány.

Abstract

Plant cell lines represent useful models in plant cell biology. They allow simple analysis of the effects of various factors including modulated gene expression at cellular and subcellular level. Tobacco BY-2 cell line is a favored model due to its high proliferation rate, capability of effective synchronization and accessibility to transformation. Relatively high uniformity of BY-2 cultures allows morphological phenotyping and assessment of growth parameters like mitotic index, viability or cell density.

Presented thesis summarizes established methods and up-to-date experience with tobacco BY-2 cell lines. Selected results of two research projects focused on hybrid proline-rich proteins and heterotrimeric G-proteins are included. These projects are treated as case studies of cell line phenotyping and evaluation of cytological parameters. Protocols and general experimental suggestions that were optimized during the solving of the projects are described and discussed.

Obsah

Poděkování	2
Seznam zkratk	4
1. Úvod	5
2. Cíle	7
3. Literární přehled	8
4. Výsledky a diskuse	13
4.1. Metody fenotypové charakterizace buněčných linií tabáku	13
4.1.1 Stanovení základních cytologických parametrů	13
4.1.2. Stanovení denzity suspenzní kultury	13
4.1.3. Měření délky a šířky buněk	16
4.1.4. Výpočet druhotných popisných veličin	19
4.1.5. Kalkulace biomasy	19
4.1.6. Stanovení růstové křivky – matematický odhad.....	20
4.1.7 Stanovení doby buněčného cyklu a trvání mitózy.....	22
4.2. Studium vlivu overexprese <i>HyPRP</i> genů jako modelová situace analýzy fenotypové variability.....	23
4.3. Studium heterotrimerních G-proteinů	25
4.4. Obecná doporučení pro hodnocení fenotypu transgenních linií odvozených od linie BY-2	27
5. Závěry.....	29
6. Seznam literatury.....	31
7. Přílohy	35
Články publikované v odborných časopisech	35
Prohlášení o autorském podílu na předkládaných publikacích	35
Dvořáková L., Srba M., Opatrný Z., Fischer L.: Hybrid proline-rich proteins: novel players in plant cell elongation? - <i>Annals of Botany</i> 109(2): 453-462, 2012.	
Phan N., Urano D., Srba M., Fischer L., Jones A. Sugar-induced endocytosis of plant 7TM-RGS proteins. - <i>Plant Signaling & Behavior</i> , 8(2), (2013)	
Srba M., Černíková A., Opatrný Z., Fischer L.: Practical guidelines for the characterization of BY-2 cell lines. – <i>Biologia Plantarum</i> v tisku	

Seznam zkratek

ANOVA	- analýza rozptylu
DB	- délka buněk
FLIM	- fluorescence-lifetime imaging microscopy
FRAP	- fluorescence recovery after photobleaching
FRET	- Förster resonance energy transfer
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 *et al.* 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. Literární přehled

Nebývalé množství genomických, transkriptomických a proteomických dat, které bylo pořízeno v nedávné době a stále se exponenciálním trendem rozrůstá, může být vědecky a prakticky využitelné pouze tehdy, je-li objasněn vztah mezi nukleotidovými či proteinovými sekvencemi a jejich biologickou funkcí. Analýza těchto dat záleží na správném propojení s adekvátními fenotypovými projevy. Velká pozornost je proto věnována nalézání konkrétních vazeb mezi genotypem a fenotypem. Pro účely mnohorozměrného, rychlého a objektivního hodnocení celých rostlin byly v poslední době zavedeny ucelené postupy fenotypování (Pieruschka a Poorter 2012). Ani kvalitní popis pozorované rostliny na organismální úrovni však nemusí zaručit porozumění chování jednotlivých buněk, které tento organismus vytváří. Z tohoto důvodu se buněčné suspenzní kultury osvědčily jako alternativní modely celé řady studií (Orchard *et al.* 2005, Richard *et al.* 2001, Schaul *et al.* 1996; přehledy pak viz Sato 2013, Seifertova *et al.* 2014). Nabízejí především možnost neinvazivního hodnocení řady cytologických parametrů. Přesto zatím nebyly v dostatečné míře etablovány ucelené postupy k jejich fenotypovému hodnocení.

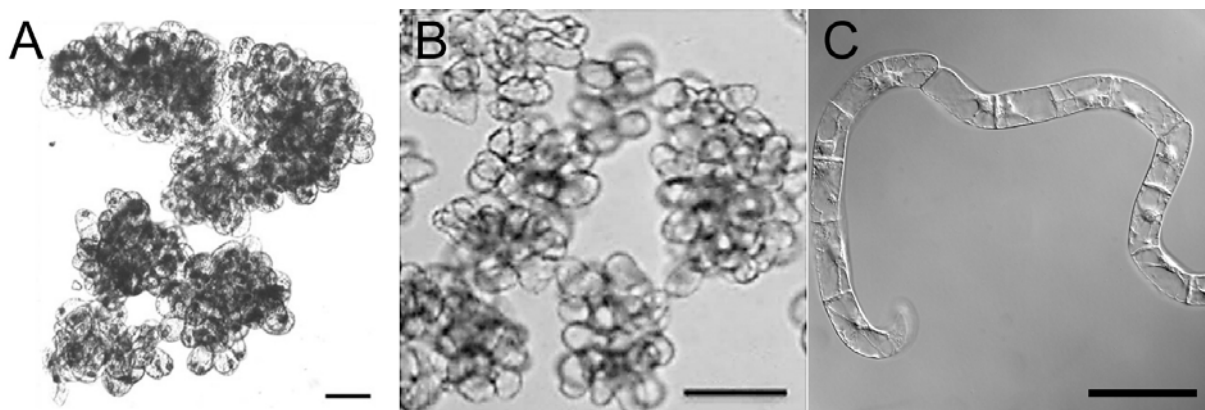
Rostlinné buněčné suspenzní kultury jsou známy již řadu let. Schopnost či neschopnost tkáňových kultur vytvořit buněčnou suspenzní kulturu je dána mírou rozpadavosti (tzv. friabilitou) kultivovaného pletiva nebo kalusu. První buněčné suspenze byly připraveny z tabáku (*Nicotiana tabacum*; Filner 1965, Nagata *et al.* 1992), topolu (*Populus* sp.; Nagata *et al.* 1992), javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*; obr. 1A; Nagata *et al.* 1992, Opatrný *et al.* 2014), sóji (*Glycine max*; Gamborg 1970) a některých dalších rostlin. Problémem hodnocení většiny dostupných buněčných suspenzních linií je vysoká morfologická variabilita jejich buněk a především pak tvorba trojrozměrných buněčných agregátů. Ty nejen že znemožňují mikroskopický vhled do buněk situovaných uvnitř agregátů, ale chovají se jako určitý „minimální organismus“ se sobě vlastní látkovou výměnou a vlastním způsobem buněčné morfogeneze, kdy buňky uvnitř agregátů se dělí a směrem ven vakuolizují, případně odumírají. U takových suspenzí převažuje jejich arteficiální povaha nad pozitivními vlastnostmi, které lze využít v buněčné biologii rostlin (Opatrný *et al.* 2014).

První linie, které svojí buněčnou morfologií a způsobem růstu splňovaly požadavky pro významnější experimentální aplikaci, byly získány z rostlin tabáku. V roce 1967 byla ze

stonkové dřeně kultivaru *Nicotiana tabacum* cv. ‚Virginia Bright Italia‘ izolována linie VBI-0 (Opatrný a Opatrná 1976, Opatrný *et al.* 2014). Vzhledem k vyšším požadavkům na standardizaci kultivace a obtížné transformovatelnosti byla tato linie v běžné praxi nahrazena plastičtější avšak fenotypově podobnou linií BY-2 (Nagata *et al.* 1992). Ta byla odvozena ze semenáčů *N. tabacum* cv. ‚Bright Yellow 2‘ před více než 40 lety v Japonsku. Původně zamýšlené biotechnologické využití nebylo úspěšné, naproti tomu se však buněčná linie BY-2 postupně stala jedním ze základních modelů rostlinné biologie. Buňky těchto linií tvoří buněčné agregáty, ale řetízky, které vykazují mimořádnou spontánní rozpadavost, díky čemuž vytváří relativně morfologicky homogenní populaci buněk dovolující přímé mikroskopické pozorování (Nagata *et al.* 1992, Opatrný *et al.* 2014). Obě linie BY-2 i VBI-0 jsou nezávislé na dodaných cytokininech avšak plně závislé na zdroji auxinu, přičemž nejvhodnější náhražkou pro tyto kultury je 2,4-D (Nagata *et al.* 1992, Orchard *et al.* 2005). Průměrná denzita kultury BY-2 se pohybuje mezi 10^5 a 10^6 buněk na 1 ml kultivačního média. Díky vysoké dělivé aktivitě může být buněčný cyklus jednotlivých buněk kultury efektivně synchronizován dočasným přidáním některých antireplikačních nebo cytoskeletálních drog. Podíl synchronizovaných buněk může dosáhnout 60-90%. (Nagata a Kumagai 1999, Kumagai-Sano *et al.* 2004, Kuthanova *et al.* 2008), což dovoluje i analýzu změn genové exprese v průběhu buněčného cyklu (Schaul *et al.* 1996, Sorrel *et al.* 1999, Sorrel *et al.* 2001, Matsuoka *et al.* 2004).

Jednou z alternativ k buněčným liniím tabáku jsou linie odvozené z *Arabidopsis thaliana*. Tyto modely mohou být upřednostňovány některými pracovními týmy díky tomu, že právě *A. thaliana* je jednoznačně nejpoužívanějším modelem základního výzkumu rostlin. Genetické, molekulární a cytologické analýzy prováděné na rostlinách tohoto druhu mohou být upřesňovány a prohlubovány na suspenzních kulturách stejného druhu. Zřejmou výhodou je tedy interpretace provedených experimentů na maximálně podobném genetickém pozadí. Buněčné linie *A. thaliana* vykazují menší dělivou aktivitu v porovnání s buněčnými liniemi tabáku. Přestože se tento parametr zdá být klíčový pro efektivitu synchronizace buněčného cyklu u kultury BY-2 (Nagata a Kumagai 1999), bylo u buněčných suspenzí *A. thaliana* dosaženo aplikací aphidicolinu přibližně 90% synchronizace, tj. výsledků plně srovnatelných s linií BY-2 (Menges a Murray 2002). Další výhodou může být přítomnost zelených chloroplastů, díky čemuž je aspoň částečně zachován autotrofní metabolismus spojený s fotosyntézou. Na druhou stranu právě hojná přítomnost dobře vyvinutých chloroplastů komplikuje použití pokročilých fluorescenčních technik mikroskopie (Seidel *et al.* 2004). Z hlediska pokročilého fenotypového hodnocení však suspenzní kultury buněk *A. thaliana*

vykazují i další nevýhody. Jedná se především o tvorbu trojrozměrných buněčných agregátů, jejichž buňky jsou navíc značně morfologicky variabilní (obr. 1B). To celkově komplikuje jejich mikroskopické a biometrické hodnocení.



Obr. 1: Fenotyp buněčných suspenzí. A) *Acer pseudoplatanus*, převzato z Opatrný *et al.* (2014). B) *Arabidopsis thaliana*, převzato z Salmon a Bayaer (2012). C) Buněčná linie tabáku BY-2. Měřítko 100 μm .

Buněčná linie tabáku BY-2 proto dnes patří mezi přední modely buněčné biologie pro studium nejrůznějších aspektů fyziologie rostlinných buněk a její význam stále narůstá (Seifertová *et al.* 2014). Ve formě suspenzní kultury jsou buňky snadno přístupné ošetření nejrůznějšími chemickými látkami a následně jsou lineární buněčné řetězky mimořádně vhodné pro okamžitou mikroskopickou a cytologickou analýzu (obr. 1C). Tyto vlastnosti pomohly k získání řady zásadních poznatků v oblasti studia rostlinného cytoskeletu (např. Kutsuma a Hasezawa 2002, Schwarzerova *et al.* 2003, Maisch *et al.* 2009, Hohenberger *et al.* 2011, Schneider *et al.* 2015), buněčného cyklu (Jovanović *et al.* 2010) nebo vzájemného vztahu formování cytoskeletu a řízení buněčné proliferace (Klotz a Nick 2012, Masoud *et al.* 2013). Buněčná linie BY-2 formující vícebuněčné řetězky rovněž sloužila pro studium komunikace mezi buňkami a synchronizace buněčného růstu (např. La Porte *et al.* 2003, Maisch a Nick 2007). Umožnila rovněž výzkum nejrůznějších faktorů ovlivňujících rostliny jako jsou fytohormony (Campanoni *et al.* 2003, Laňková *et al.* 2010), toxické kovy jako je kadmium (Kuthanova *et al.* 2008, Ma *et al.* 2010, Kutík *et al.* 2014) nebo hliník (Pejchar *et al.* 2010, Krtkova *et al.* 2012). Protoplasty získané z buněk linie BY-2 byly rovněž využity pro studium polaritu buněčného růstu (Zaban *et al.* 2013). Linie BY-2 rovněž nachází uplatnění v recentním farmaceutickém výzkumu a biotechnologických aplikacích (Kaldis *et al.* 2013). Vzhledem k „nezelené“ povaze je linie BY-2 mnohem lépe použitelná pro

pokročilé fluorescenční techniky mikroskopie jako je FRET, FLIM nebo FRAP a může být v tomto ohledu alternativou ke kořenovým vláskům *A. thaliana* nebo izolovaným protoplastům. Použití těchto technik může být pouze komplikováno nezanedbatelnou oranžovou autofluorescencí přítomných proplastidů pozorovatelnou po osvětlení ultrafialovým až modrým světlem (Nagata *et al.* 1992). Tato autofluorescence může komplikovat kvantifikaci fluorescence žlutých a červených fluorescenčních proteinů. Tento efekt je však méně významný než u buněk linií *A. thaliana*.

Modelová linie BY-2 se stala rovněž důležitým nástrojem pro funkční genomiku na buněčné úrovni. Studium účinků zvýšení popř. snížení hladiny určitého proteinu je však podobně jako u celistvých transgenních rostlin komplikováno rozdíly a variabilitou v genové expresi nezávisle transformovaných řetězků a z nich odvozených linií. Tato variabilita je dána rozdílným místem začlenění T-DNA do genomu, rozdílným počtem začleněných kopií a následně též poměrně dynamickým procesem samovolného umlčení vnesených transgenů (Nocarova a Fischer 2009). Tento zdroj variability navíc interferuje s vnitřní variabilitou modelové linie, která je sice mezi dostupnými modely jednoznačně nejnižší, přesto však do určité míry maskuje samotný vliv experimentálně modulované exprese některých genů (Dvořáková *et al.* 2012). Experimentální uspořádání spolehlivě odkrývající vztah mezi genotypem a změnami v buněčném fenotypu proto není vždy zcela přímočaré.

Vliv modulované genové exprese může být u suspenzních buněk BY-2 posuzován v řadě parametrů: viabilita buněk, dělivá aktivita, tvar a rozměry buněk, polarita růstu, dělení buněk a případně též analýza transkripce markerů programované buněčné smrti nebo jiných genů souvisejících s předmětem zájmu. Pro maximální využití tohoto potenciálu je však třeba mít k dispozici soubor jednoduchých, rychlých a přitom nanejvýš spolehlivých postupů měření sledovaných parametrů. Richard *et al.* (2001) publikovali příkladnou práci prezentující zevrubné hodnocení buněčné suspenze *Arabidopsis thaliana* včetně souhrnu adekvátních biometrických a matematických postupů. Překvapivě stěžejní metodické přehledy věnované linii BY-2 (Nagata 2004; Nagata *et al.* 2006) věnují metodice fenotypové analýzy jen malou pozornost.

Předmětem předkládané práce je optimalizace zavedených cytologických postupů pro fenotypovou analýzu transgenních nebo jinak experimentálně ovlivněných linií odvozených od buněčné linie tabáku BY-2. Celkové metodické postupy, od mikroskopické analýzy až po statistické zpracování dat, musí být dostatečně efektivní, aby dokázaly odlišit relevantní změny způsobené experimentálním ošetřením (popř. transgenozí). Vzhledem k tomu že fenotyp transgenních linií vykazuje značnou variabilitu danou překryvem vnitřní variability

modelové linie a variability dané geneticky (místo začlenění a počet kopií T-DNA) a epigeneticky (samovolné umlčování exprese), existuje zde značný tlak na to, aby metody hodnocení byly maximálně jednoduché a rychlé. Jen tak je možné v přiměřeném čase s nasazením dostupného vybavení a lidské práce zhodnotit dostatečné množství individuálních linií popř. klonů, aby bylo možné spolehlivě odlišit projev experimentálního ošetření popř. transgenní fenotyp od variability vzniklé výše uvedenými mechanismy.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Metody fenotypové charakterizace buněčných linií tabáku

4.1.1 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)

4.1.2. 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. Existují sice speciální typy počítacích komůrek s větší hloubkou (např. 0,5 mm; typ Nageotte) avšak pro hodnocení vzorků kultury BY-2 nejsou vhodné vzhledem k problematickému prooštění tak hluboké vrstvy a tím pádem nemožnému pořízení kvalitních obrazových dat pro obrazovou analýzu (Srba *et al.* v tisku).

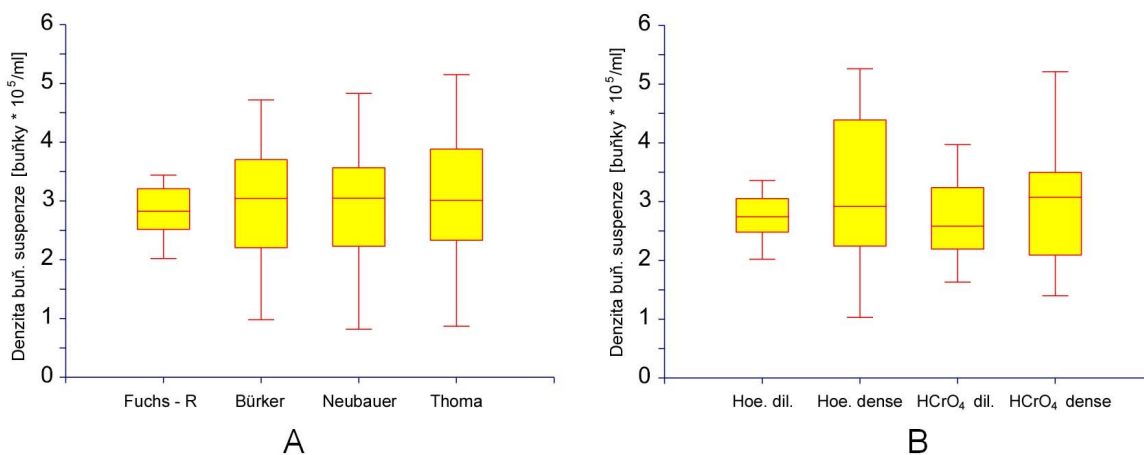
Optimalizovaný postup stanovení denzity buněk linie BY-2 je založen na modifikovaném použití počítací komůrky Fuchs Rosenthal o hloubce 200 μm , která v porovnání s méně hlubokými komůrkami poskytuje více vyrovnaná data, viz obr. 2A. Klasický protokol využití počítací komůrky předpokládá aplikaci vzorku v nadbytku, který je následně odveden odtokovými kanálky. Takový postup u linie BY-2 není použitelný, jelikož se suspenze buněk této linie nechová jako ideální kapalina. Při přílišném pohybu v komůrce tvoří řetízky buněk často velké shluky, které se nahromadí buďto v prostoru mřížky a nebo naopak v odtokových kanálcích, takže ve sčítaném poli zůstane téměř čisté médium. Proto je třeba analyzovanou suspenzi do počítací komůrky aplikovat v podobě malé kapky o velikosti cca. 3 mm (objem 15 – 20 μl), která po přiklopení krycího sklíčka zaujme přesně prostor pod sklíčkem a zbytečně se nepohybuje (Seifertová osobní sdělení, Srba *et al.* v tisku). Hustější suspenze buněk, typicky od 3. až 4. dne SBI je třeba před stanovením denzity naředit tak, aby se v prostoru mřížky nacházelo přibližně 150 – 1500 buněk. Takové zředění zároveň dovoluje reprodukovatelné pipetování buněčné suspenze ustříženou špičkou.

Posledním krokem stanovení denzity buněčné suspenze je adaptace protokolu na poloautomatické počítačové vyhodnocení. Analyzované vzorky lze z mikroskopu snímat kamerovým systémem a pořízené obrázky následně analyzovat softwarem obrazové analýzy. Pro potřeby efektivní počítačové analýzy je třeba dbát na vysokou kvalitu pořizovaných dat, aby následná obrazová analýza mohla být maximálně automatická. Požadavky na obrazová data jsou následující:

- 1) jádra hodnocených buněk musí být dostatečně kontrastní (barvení Hoechst 33258, DAPI, ...)
- 2) velikost jader na pořízených snímcích musí být minimálně 5 pixelů, aby byla softwarově odlišitelná i u nahlučených buněk
- 3) mikroskopické zvětšení by však nemělo být příliš velké, aby dovolovalo kvalitní zaostření celé hloubky počítací komůrky (nezaostřená jádra nejsou na snímcích dostatečně kontrastní)
- 4) snímky by měly zabírat větší plochu počítací komůrky, tak aby byly maximálně reprezentativní. Body 2, 3, 4 jsou zpravidla splněny při použití objektivu 4x nebo 10x s přihlédnutím k rozlišení snímací kamery.

Časově odložené pořízení numerických dat experimentálnímu pracovníkovi umožní zpracování většího množství vzorků (variant či opakování) v dostupném čase. Jsou-li soubory s obrazovými daty pojmenovány adekvátním způsobem v číselných řadách, umožňují pokročilejší systémy obrazové analýzy plně automatické vyhodnocení celých složek obrázků, vč. základního statistického zpracování pořízených numerických dat.

Nesourodou vnitřní strukturu buněčné suspenze BY-2, která komplikuje stanovení buněčné denzity pomocí počítačích komůrek lze řešit histologickou metodikou macerace (Johansen 1940, Brown & Rickless 1949). Tyto postupy zajišťují rozvolnění střední lamely a zároveň výrazné změkčení buněčné stěny (Johansen 1940, Němec 1962). V případě buněčné linie BY-2 poskytla nejlepší výsledky tzv. kyselá macerace s použitím kyseliny chlorovodíkové a dále macerace s použitím kyseliny chromové, resp. roztoku oxidu chromového. Macerované suspenze bylo možné aplikovat ve značném rozpětí hustoty, aniž by byly výsledné hodnoty stanovené denzity ovlivněny, viz obr. 2B. Nevýhodou je větší pracnost přípravy vzorků a v případě použití HCrO_4 též její vysoká toxicita (Dayan a Paine 2001). Další nevýhodou je destruktivní povaha maceračních technik, která znemožňuje hodnocení dalších cytologických parametrů na jednom vzorku (snímku).



Obr. 2. Stanovení denzity buněčné kultury. A) Krabicové diagramy číselných souborů denzity získané v počítačích komůrkách: Fuchs – Rosenthal (doporučeno), Bürker, Neubauer and Thoma. B) Krabicové diagramy číselných souborů denzity získané s použitím komůrky Fuchs - Rosenthal chamber po čtyřech různých přípravách vzorků: Hoe. dil., kultura zředěná podle doporučení + barvení Hoechst, Hoe. dense. neředěná kultura (5x hustší vzorek) + barvení Hoechst, HCrO₄ dil., zředěná suspenze + macerace HCrO₄, HCrO₄ dense., neředěná suspenze (5x hustší vzorek) + macerace HCrO₄.

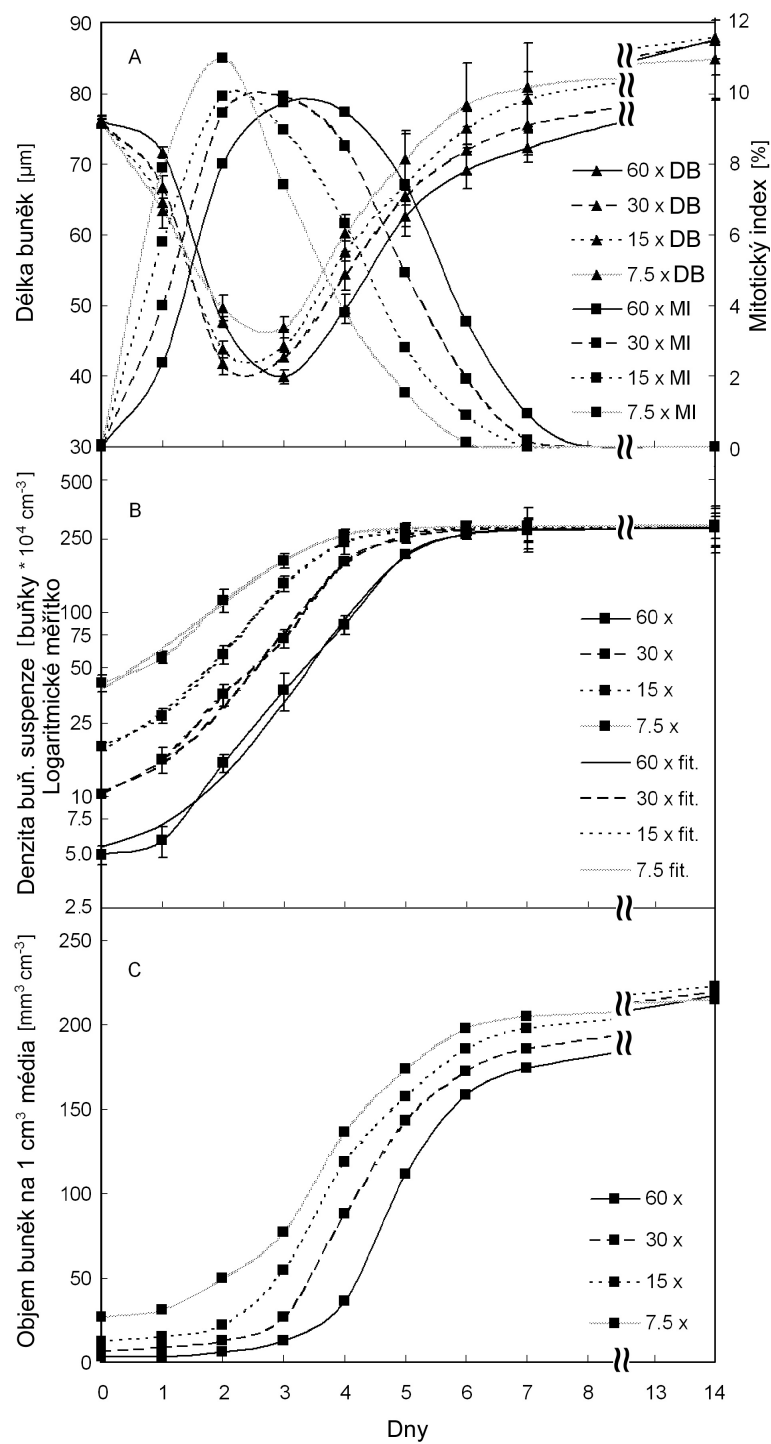
4.1.3. Měření délky a šířky buněk

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. Případné naměřené změny v délce buněk mezi experimentálními variantami proto mohou být odrazem ovlivnění jak dělivé aktivity buněk, tak změnami v dynamice buněčné elongace. Vzhledem k tomu, že dělení buněk v počátečních fázích SBI je výrazně ovlivněno stavem výchozí kultury a velikostí inokula (Nagata a Kumagai 1999), musí být tyto parametry při zakládání pokusů s cílem hodnotit buněčnou morfologii nanejvýš striktně normalizovány. V případě, že není předem znám projev experimentálního ošetření nebo povaha fenotypu hodnocených transgenních linií, lze doporučit hodnocení buněčné délky ve stacionární fázi SBI. Zde již nedochází k interferenci dělení buněk a buněčného dloužení. Rovněž bylo zjištěno, že variační koeficient metrických dat je u stacionárních buněk nižší, a pořizovaná data jsou proto spolehlivější, resp. pro získání reprodukovatelných výsledků stačí pořizovat menší datové soubory (Srba *et al.* v tisku).

Biometrická data charakterizující délku buněk linie BY-2 vyžadují v určitých ohledech specifické zpracování. Prvním důvodem je určitá míra vnitřní závislosti naměřených dat. Bylo zjištěno, že buňky v rámci buněčného řetízku jsou si oproti celé buněčné populaci více podobné. To může být způsobeno jejich společným původem z jediné buňky, existují však též práce, které ukazují i další možné příčiny této uniformity jako jsou symplastické propojení a následná fyziologická synchronizovanost buněk uvnitř řetízku (Laporte *et al.* 2003, Campanoni *et al.* 2003, Maisch a Nick 2007). Z pohledu statistického hodnocení by proto bylo neúčinnější pořizovat metrická data se záznamy o příslušnosti jednotlivých buněk k určitým řetízkům a faktor řetízku zanechat do modelu výpočtu analýzy rozptylu jako tzv. náhodný efekt („random effect“). Z praktického hlediska je však tento způsob pořizování dat mimořádně pracný, u méně přehledných mikroskopických preparátů téměř nemožný. Srovnání základního modelu analýzy rozptylu a modelu doplněného o faktor řetízků sice ukázalo, že při zanesení tohoto faktoru lze stejné výpovědní hodnoty statistického modelu dosáhnout při přibližně třetinovém množství pořizovaných dat. Z praktického hlediska je však výrazně rychlejší a jednodušší pořádit přibližně trojnásobně velký soubor dat bez údajů o příslušnosti k jednotlivým řetízkům a tyto pak srovnávat základním modelem analýzy rozptylu nebo párově neparametrickým Kruskal-Walisovým testem (Srba *et al.* v tisku)

Dalším specifikem dat popisujících délku buněk linie BY-2 je šikmost histogramu. Ta je dána skutečností, že buňky této linie jsou jen velmi vzácně kratší než 30 μm , zatímco na druhé straně histogramu mohou dosahovat až velmi vysokých hodnot ve stovkách μm . Vzhledem ke snadné dostupnosti velkých datových souborů ($n > 100$) však může být tato odchylka od normálního rozložení dat zanedbána, jelikož analýza rozptylu je u takto velkých souborů vůči tomuto problému robustní (Milliken a Johnson 1984). Pro párové srovnání délek buněk u jednotlivých linií je však vhodné využívat neparametrických testů jako např. Tukey – Kramerův test (Hoaglin *et al.* 2011, Srba *et al.* v tisku).

Obdobně jako délku buněk lze metodami obrazové analýzy měřit i jejich šířku. Tento parametr je však v porovnání s délkou buněk zpravidla velmi konstantní, zejména pak u kultur, které prošly klonováním, viz kapitola 4.2. Šířku buněk je vhodné stanovovat v definovaném úseku, vhodným standardem je například kolmice na osu buňky v místě uložení buněčného jádra. V tomto místě dosahují typickou šířku též zašpičatělé buňky na koncích řetízků. Numerická data šířky vykazují normální rozložení, lze je tedy bez problémů srovnávat analýzou rozptylu (ANOVA), popřípadě párově parametrickým t-testem.



Obr. 3: 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) Densita buněčné suspenze. C) Vypočtená biomasa (výpočet na základě známé velikosti buněk a jejich density).

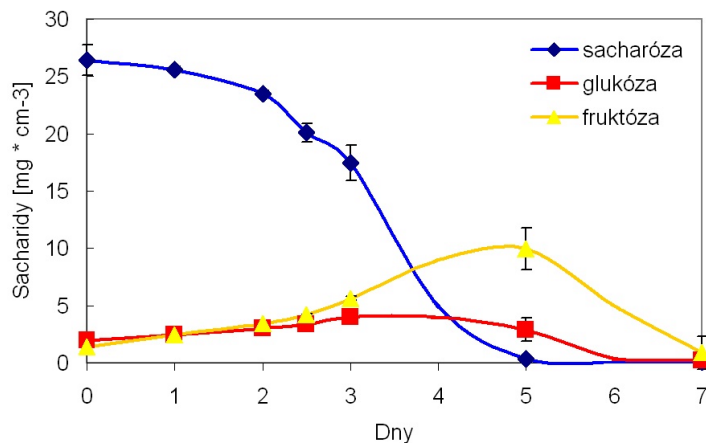
4.1.4. Výpočet druhotných popisných veličin

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.

4.1.5. 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 3C. Je zde patrný dramatický nárůst vypočtené biomasy cca uprostřed subkultivačního intervalu, který je daný synergickým efektem vysoké mitotické aktivity měřené kultury a počínající fázi elongace buněk. Tuto dramatickou změnu lze pozorovat i makroskopicky, kdy kultura téměř během jediného dne změni 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. 4, které jsou buňkami linie BY-2 přednostně matabolizovány (Hartig a Beck 2006).



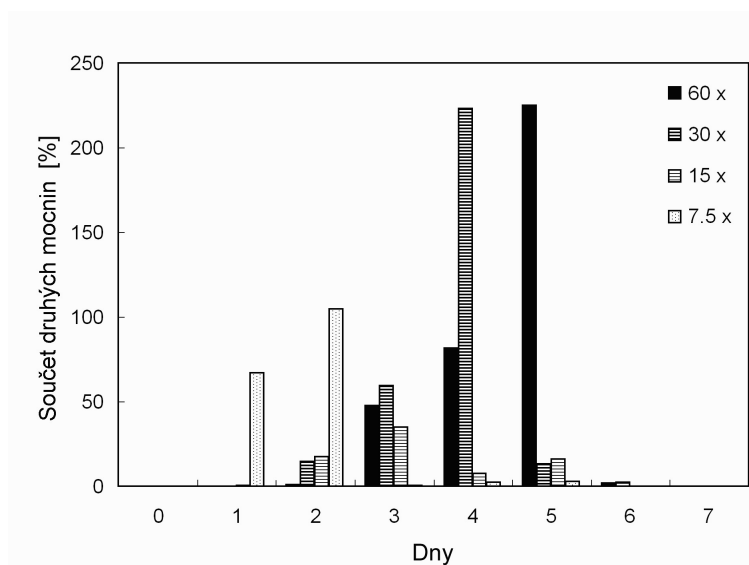
Obr. 4: Koncentrace sacharidů v kultivačním médiu standardně kultivované linie BY-2 během subkultivačního intervalu (Srba a Lipavská nepublikované výsledky).

4.1.6. Stanovení růstové křivky – matematický odhad

Primární data stanovení denzity buněčných suspenzí s pomocí počítačích komůrek vykazují poměrně vysokou variabilitu. I s použitím optimalizovaného postupu viz kap. 4.1.2. 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 odvozená doba růstového 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 pořízenými 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 3B srovnává průběh růstových křivek rozdílně ředěných 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 též 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. 5. 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. 5: Relativní důležitost měření hustoty buněčné suspenze v jednotlivých dnech SBI. Čtyři varianty standardně kultivované linie BY-2 lišící se počátečním ředěním při inokulaci. Sloupčky vyjadřují nárůst sumy druhých mocnin odchylky (v každém dnu) mezi křivkou sestavenou ze všech dat a mezi vypočtenou křivkou s vynecháním daného dne.

4.1.7 Stanovení doby buněčného cyklu a trvání mitózy

Exponenciální fáze růstu buněčné linie se projevuje při logaritmickeém 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 * mitotický index. Doba vypočtená na základě našich dat odpovídá přibližně dvěma hodinám, což je opět v souladu s dříve publikovanými daty (Granger a Cyr 2000).

4.2. Studium vlivu overexprese *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).

Prvním krokem, který zvyšuje morfologickou variabilitu buněk transgenních linií BY-2 jsou přechody z kalusové kultury do podoby buněčné suspenze a naopak. Tento krok je nedílnou součástí přípravy transgenních linií. Za účelem kontrolního stanovení tohoto typu variability byla buněčná suspenze výchozí linie BY-2 převedena rozlivem na tuhé médium do podoby kalusové kultury a takto po dobu dvou měsíců kultivována. Následně byly tři kalusy velikostně a stářím odpovídající kalusům transgenních linií převedeny zpět do suspenzní kultury. Překvapivě se ukázalo, že jedna z těchto suspenzí se v délce buněk liší o 15 % od dvou zbývajících a tento rozdíl byl statisticky významný. Biologické pozadí takového posunu je obtížné interpretovat. Může souviset s reorganizací cytoskeletu (Fischer a Cyr 1998, Paredez *et al.* 2006) popřípadě rozdílným obsahem zásobních látek výchozí kalusové kultury. Výsledky této kategorie kontrol však jednoznačně ukázaly, že s vlivem převodu kalus ↔ suspenzní kultura je třeba počítat.

V případě hodnocení transgenních linií je navíc nutné zařadit kontrolu efektu vlastní transgenoze. Tou může být série linií transformovaných „prázdným“ binárním vektorem popř. vektorem s reportérovým genem, jenž by měl být podle dostupných informací vůči fenotypu neutrální (např. genem pro cytoplasmaticky lokalizované GFP; Seth *et al.* 1998, Stewart 2001).

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 exprimujících studovaný gen.

Podstatné však bylo zjištění, že populace *HyPRP* 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. Výrazně vyšší korelace však byla pozorována mezi fenotypem a součtem exprese vneseného genu a exprese genu interního. 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 tvarovou pamětí buněk danou vztahem kortikálního mikrotubulového cytoskeletu a mikrofibril primární buněčné stěny (Paredes *et al.* 2006) a rovněž být zajímavým modelem pro studium orientace buněčného růstu (Peña 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.

4.3. Studium heterotrimerních G-proteinů

Vedle dobře známé možnosti synchronizace buněk v určité 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 dlouživé 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).

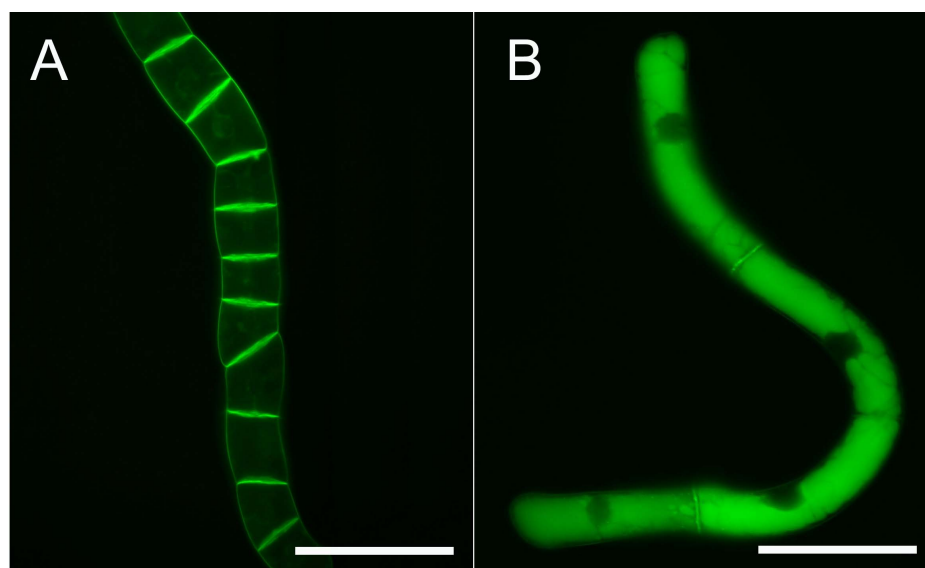
Při analýzách linií transformovaných konstruktem *RGS1:GFP* byly pozorovány cyklické změny v lokalizaci fluorescenčního signálu. Zatímco u exponenciálně se dělicích buněk byla pozorována očekávaná lokalizace v plazmatické membráně, ve fázi stacionární tento signál z membrány mizí a masivně se objevuje ve vakuole (obr. 6). 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 standardní kultivaci 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. denzitě 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 nespecifickou reakci na stres spojenou s autofagií (Toyooka *et al.* 2006).

Zjištění, že je možné i u cukerně 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. 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), umožňují sledovat reakci buněk (změny lokalizace RGS1) po definované aplikaci vybraných cukrů.

První 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 v médiu nejdříve rozštěpena 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. 4 (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 nasazeny do média s 1,5% glukózou namísto 3% sacharózy (zachování osmolarity prostředí). Reakce kultur byly překvapivě velmi příznivé – růst linií byl téměř normální. Byla

pozorována pouze mírně 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* ($=G\alpha$).



Obr. 6: Buněčná linie tabáku exprimující *RGS1:GFP*. A) Exponenciální kultura s proteinem lokalizovaným v plazmetické membráně. B) Stacionární kultura s fluorescenčním signálem ve vakuole. Měřítko 100 μ m.

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

Celkové metodické přístupy optimalizující hodnocení fenotypu buněčných linií tabáku byly shrnuty 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 i 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 4.1.3., 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 tohoto 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.

5. 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.

6. 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)**: 1636-1646, 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.

Dayan A.D., Paine A.J.: Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. - *Human & Experimental Toxicology*, **20(9)**: 439-451, 2001.

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.

Filner P.: Semi-conservative replication of DNA in a higher plant cell. - *Experimental cell research*, **39(1)**: 33-39, 1965.

Fisher D. D., Cyr R. J.: Extending the microtubule/microfibril paradigm cellulose synthesis is required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells. - *Plant Physiology*, **116(3)**: 1043-1051, 2006.

Gamborg O. L.: The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. - *Plant Physiology*, **45(4)**: 372-375, 1970.

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.

Hoaglin D.C., Mosteller F., Tukey F.W.: *Exploring Data Tables, Trends, and Shapes*. - John Wiley & Sons. 560 pp., 2011.

Hohenberger P., Eing C., Straessner R., Durst S., Frey W., Nick P.: Plant actin controls membrane permeability. - *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1808(9)**: 2304-2312, 2011.

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.

Jovanović A. M., Durst S., Nick, P.: Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *Journal of experimental botany*, **61(3)**: 901-909, 2010.

- Kaldis A., Ahmad A., Reid A., McGarvey B., Brandle J., Ma S., Jevnikar A., Kohalmi S. E., Menassa, R.: High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. - *Plant biotechnology journal*, **11(5)**: 535-545, 2013
- Klotz J., Nick P.: A novel actin–microtubule cross-linking kinesin, NtKCH, functions in cell expansion and division. *New Phytologist*, **193(3)**: 576-589, 2012.
- Kouri T., Gyory A., Rowan R.M.: ISLH Recommended Reference Procedure for the Enumeration of Particles in Urine. - *Laboratory Hematology* **9**: 58-63, 2003.
- Kumagai-Sano F., Hayashi T., Sano T., Hasezawa S.: Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. - *Nature protocols*, **1(6)**: 2621-2627, 2007.
- Kuthanova A., Fischer L., Nick P., Opatrný Z.: Cell cycle phase specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. - *Plant Cell and Environment* **31(11)**: 1634-1643, 2008.
- Kutík J., Kuthanová A., Smertenko A., Fischer L., Opatrný Z.: Cadmium-induced cell death in BY-2 cell culture starts with vacuolization of cytoplasm and terminates with necrosis. - *Physiologia plantarum*, **151(4)**: 423-433, 2014.
- Kutsuma N., Hasezawa S.: Dynamic Organization of Vacuolar and Microtubule Structures during Cell Cycle Progression in Synchronized Tobacco BY-2 Cells - *Plant Cell Physiology* **43(9)**: 965-973, 2002.
- Laňková M., Smith R. S., Pešek B., Kubeš M., Zažímalová E., Petrášek J., Hoyerová K.: Auxin influx inhibitors 1-NOA, 2-NOA, and CHPAA interfere with membrane dynamics in tobacco cells. - *Journal of experimental botany*, **61(13)**: 3589-3598, 2010.
- 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.
- Ma W., Xu W., Xu H., Chen Y., He Z., Ma M.: Nitric oxide modulates cadmium influx during cadmium-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. - *Planta*, **232(2)**: 325-335, 2010.
- Maisch J., Nick P.: Actin Is Involved in Auxin-Dependent Patterning. - *Plant Physiology* **143**: 1695-1704, 2007.
- Maisch J., Fiserova J., Fischer L., Nick P.: Tobacco Arp 3 is localized to actin-nucleating sites *in vivo*. - *Journal of Experimental Botany* **60**: 603-614, 2009.
- Masoud K., Herzog E., Chabouté M. E., Schmit A. C.: Microtubule nucleation and establishment of the mitotic spindle in vascular plant cells. - *The Plant Journal*, **75(2)**: 245-257, 2013.
- Matsuoka K., Demura T., Galis I., Horiguchi T., Sasaki M., Tashiro G., Fukuda H.: A Comprehensive Gene Expression Analysis Toward the Understanding of Growth and Differentiation of Tobacco BY-2 Cells. - *Plant Cell Physiology* **45(9)**: 1280-1289, 2004.
- Milliken G.A., Johnson D.E.: Analysis of messy data. - Volume 1 Designed experiments. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 473pp., 1984.
- Menges M., Murray J. A.: Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. - *The Plant Journal*, **30(2)**: 203-212, 2002.

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.

Nagata T.: When I encountered tobacco BY-2 cells! – In: Nagata T., Hasezawa S., Inzé D. (ed.) *Tobacco BY-2 Cells. Biotechnology in Agriculture and Forestry Volume 53*: Pp. 1-5, Springer Berlin Heidelberg 2004.

Nagata T., Matsuoka K., Inzé D. (ed.): *Tobacco BY-2 Cells: From cellular dynamics to omics Biotechnology - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Agriculture and Forestry Volume 58*: 107-115, 2006.

Němec B.: *Botanická mikrotechnika*. - Nakladatelství československé akademie věd. Praha. 485 pp., 1962.

Nocarova E., Fischer L.: Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. - *BMC Plant Biology* **9**: 44-55, 2009.

Opatrný Z., Opatrná J.: The specificity of the effect of 2,4-D and NAA on the growth, micromorphology, and occurrence of starch in long-term *Nicotiana tabacum* L. cell strains. - *Biologia plantarum* **18**: 359-365, 1976.

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

Orchard C.B., Siciliano I., Sorrell D.A., Marchbank A., Rogers H.J., Francis D., Herbert R.J., Suchomelova P., Lipavska H., Azmi A., Onckelen H.V.: Tobacco BY-2 cells expressing fission yeast *cdc25* bypass a G2/M block on the cell cycle. - *The Plant Journal* **44(2)**: 290-299, 2005.

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

Pejchar P., Potocký M., Novotná Z., Veselková Š., Kocourková D., Valentová O., Schwarzerová K., Martinec J.: Aluminium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in tobacco cells. - *New Phytologist*, **188(1)**: 150-160, 2010.

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

Pieruschka R., Poorter H.: Phenotyping plants: genes, phenes and machines. - *Functional Plant Biology*, **39(11)**: 813-820, 2012.

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.

Salmon M. S., Bayer E. M.: Dissecting plasmodesmata molecular composition by mass spectrometry-based proteomics. - *Frontiers in plant science* (**3**): 2012.

Sato F.: Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications. - *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77(1)**: 1-9, 2013.

Schaul O., Mironov V., Burssens S., Van Montagu M., Inze D.: Two Arabidopsis cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. - *Proceedings of the National Academy Sciences USA* **93**: 4868-4872, 1996.

Schneider N., Ludwig H., Nick P.: Suppression of tubulin deetyrosination by parthenolide recruits the plant-specific kinesin KCH to cortical microtubules. - *Journal of experimental botany*, **66(7)**: 2001-2011, 2015.

Schwarzerova K., Pokorna J., Petrasek J., Zelenkova S., Capkova V., Janotova I., Opatrny Z.: The structure of cortical cytoplasm in cold-treated tobacco cells: the role of the cytoskeleton and the endomembrane system. - *Cell Biology International* **27(3)**: 263-265, 2003.

Seidel T., Kluge C., Hanitzsch M., Roß J., Sauer M., Dietz K. J., Gollack D.: Colocalization and FRET-analysis of subunits c and a of the vacuolar H⁺-ATPase in living plant cells. *Journal of biotechnology*, **112(1)**: 165-175, 2004.

Seifertova D., Klima P., Parezova M., Petrasek J., Zazimalova E., Opatrny 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.

Sorrell D.A., Combettes B., Chaubet-Gigot N., Gigot C., Murray J.A.H.: Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cells. - *Plant Physiology* **119**: 343-351, 1999.

Sorrell D.A., Menges M., Healy J.S., Deveaux Y., Amano C., Su Y., Nakagami H., Shinmyo A., Doonan A.H., Sekine M., Murray J.A.: Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. - *Plant Physiology* **126(3)**: 1214-1223, 2001.

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

Stewart C.N.: The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. - *Plant Cell Reports* **20**: 376-382, 2001.

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.

Zaban B., Maisch J., Nick P.: Dynamic actin controls polarity induction de novo in protoplasts. - *Journal of integrative plant biology*, **55(2)**: 142-159, (2013).

7. Přílohy

Články publikované 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* v tisku

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.

Hybrid proline-rich proteins: novel players in plant cell elongation?

Lenka Dvořáková[†], Miroslav Srba[†], Zdenek Opatrny and Lukas Fischer*

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Experimental Plant Biology, Vinicna 5, CZ 128 44 Prague 2, Czech Republic

[†]These authors contributed equally to the work.

*For correspondence. E-mail lukasf@natur.cuni.cz

Received: 13 June 2011 Returned for revision: 20 July 2011 Accepted: 5 October 2011 Published electronically: 25 October 2011

- **Background and Aims** Hybrid proline-rich proteins (HyPRPs) represent a large family of putative cell-wall proteins characterized by the presence of a variable N-terminal domain and a conserved C-terminal domain that is related to non-specific lipid transfer proteins. The function of HyPRPs remains unclear, but their widespread occurrence and abundant expression patterns indicate that they may be involved in a basic cellular process.
- **Methods** To elucidate the cellular function of HyPRPs, we modulated the expression of three *HyPRP* genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cell lines and in potato (*Solanum tuberosum*) plants.
- **Key Results** In BY-2 lines, over-expression of the three *HyPRP* genes with different types of N-terminal domains resulted in similar phenotypic changes, namely increased cell elongation, both in suspension culture and on solid media where the over-expression resulted in enhanced calli size. The over-expressing cells showed increased plasmolysis in a hypertonic mannitol solution and accelerated rate of protoplast release, suggesting loosening of the cell walls. In contrast to BY-2 lines, no phenotypic changes were observed in potato plants over-expressing the same or analogous *HyPRP* genes, presumably due to more complex compensatory mechanisms *in planta*.
- **Conclusions** Based on the results from BY-2 lines, we propose that HyPRPs, more specifically their C-terminal domains, represent a novel group of proteins involved in cell expansion.

Key words: Cell extension, cell wall loosening, cell wall protein, hybrid proline-rich proteins, HyPRP, lipid transfer proteins, LTP, potato, *Solanum tuberosum*, tobacco, *Nicotiana tabacum*, BY-2 cell line.

INTRODUCTION

Hybrid proline-rich proteins (HyPRPs) represent a group of putative cell-wall proteins characterized by an unusual domain structure, which was deduced only from the primary amino acid sequence, as no HyPRP has been characterized directly on the protein level. The N-terminal domains resemble typical structural cell-wall proteins, especially a group of proline-rich proteins (PRPs) in which the domains are often repetitive and usually rich in proline. However, HyPRPs do not contain amino acid motifs that are typically found in PRPs (Josè-Estanyol *et al.*, 2004). The N-terminal domains of HyPRPs are highly variable in size and amino acid composition – in some proteins glycine even predominates over proline (Josè-Estanyol *et al.*, 2004; Dvořáková *et al.*, 2007). The primary amino acid sequence of some proline-rich domains indicates possible glycosylation with arabinogalactan polysaccharides (Showalter *et al.*, 2010), but it is not a common feature of the whole family. The C-terminal domain is atypical for structural cell-wall proteins. It is rather hydrophobic and consists of several putative α -helices, which could be transmembrane. However, the presence of eight cysteine residues arranged in a specific pattern indicates that HyPRPs belong to the large superfamily of eight-cysteine motif (8CM) proteins, together with well characterized lipid-transfer proteins (LTPs) and several other groups of extracellular proteins (Josè-Estanyol *et al.*, 2004). The 8CM residues of

these proteins are not integrated within the membrane. The 8CM domains usually consist of 90–100 amino acids, where the eight cysteine residues are believed to be essential for the formation of a three-dimensional structure. The tertiary structure of the 8CM domain, which has been determined for LTPs and some other members of the 8CM family, consists of four α -helices held in a compact fold by four disulfide bridges that form a hydrophobic cavity/tunnel inside (Gincel *et al.*, 1994). The cavity of LTPs was shown to bind a variety of lipids and other hydrophobic ligands (Yeats and Rose, 2008). As well as the above-mentioned members of the 8CM superfamily, there are other proteins containing domains with eight conserved cysteines residues, e.g. lectins with cysteine-rich hevein domains (Van Damme *et al.*, 2004) or wheat germ agglutinin, characterized by so called toxin-agglutinin fold kept by four cysteine bridges (Drenth *et al.*, 1980). However, the cysteine pattern, cysteine bridging, the hydrophobicity profile and the size of these domains differ significantly from 8CM domains.

HyPRPs form large gene families with up to 52 members in maize (Dvořáková *et al.*, 2007). Expression of *HyPRP* genes was detected in various stages of plant ontogeny and in various tissues of many seed plant species. The expression was also affected by numerous endogenous and environmental factors (Josè-Estanyol and Puigdomènech, 2000). A comprehensive analysis of 14 potato *HyPRP* genes showed highly variable, partially overlapping and/or complementary

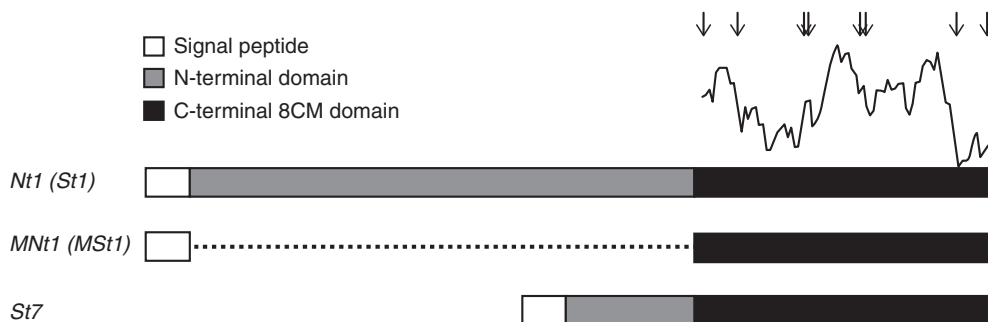


FIG. 1. Schematic illustration of the *HyPRP* genes used in the study. The curve above the C-terminal domain shows helix propensity of the sequence (ProtScale–Chou and Fasman algorithm; www.expasy.org; Gaisteiger *et al.*, 2005). Arrows indicate positions of eight conserved cysteine residues. The dotted line indicates the deleted sequence of the N-terminal domain in *MNt1* and *MSt1* genes.

expression patterns in different organs. In arabidopsis, the expression patterns were partially conserved between closely related paralogous genes (Dvořáková *et al.*, 2007), whereas almost identical orthologous *HyPRP* genes *TPRP-F1* and *StPRP* from tomato and potato exhibited almost completely different expression patterns (Fischer *et al.*, 2002).

The role of HyPRPs as well as their precise localization in the cell wall remains unclear, in contrast to the relatively better characterized families of other structural cell-wall proteins. The function of HyPRPs has been inferred primarily from their expression profiles, so the spectrum of proposed functions reflects the variation of their expression. For example, the HyPRPs DC2-15 (*Daucus carota*), FaHyPRP (*Fragaria ananassa*) and CELPs (*Nicotiana tabacum*) have been suggested to play roles in plant ontogeny and morphogenesis of different organs (Wu *et al.*, 1993; Holk *et al.*, 2002; Blanco-Portales *et al.*, 2004); BnPRP (*Brassica napus*), CcHyPRP (*Cajanus cajan*), EARLI1 (*Arabidopsis thaliana*) and MsPRP2 (*Medicago sativa*) to play roles in plant responses to multiple stress factors like cold, frost, drought, salinity and heat (e.g. Deutch and Winicov, 1995; Goodwin *et al.*, 1996; Zhang and Schläppi, 2007; Priyanka *et al.*, 2010); and SbPRP (*Glycine max*), ZmHyPRP (*Zea mays*) and MtPPRD1 (*Medicago truncatula*) to be involved in plant defenses against viral or fungal pathogens (Josè-Estanyol *et al.*, 1992; He *et al.*, 2002; Bouton *et al.*, 2005).

Although many roles have been suggested for HyPRPs *in planta*, the mechanistic insight into their function in the cell wall has been lacking. According to Blanco-Portales *et al.* (2004) a C-terminal domain of strawberry FaHyPRP may reside in plasma membrane and the N-terminal part may anchor cell-wall polymeric polyphenols. The function of HyPRPs in the interconnections between the plasma membrane (by the hydrophobic C-terminal domain) and the cell wall (by the N-terminal domain) was also suggested by other authors (Deutch and Winicov, 1995; Goodwin *et al.*, 1996; Holk *et al.*, 2002; Zhang and Schläppi, 2007). The structural reinforcement mediated by such interconnections might protect cells against plasmolysis in various stress reactions (Goodwin *et al.*, 1996). However, as already mentioned, the α -helices of the C-terminal domain are unlikely to be trans-membrane. Therefore, we presumed that the domain either interacts with the plasma membrane through some specific binding site or with some molecules within the cell wall. Alternatively, because the N-terminal proline-rich domains

are expected to interact with different cell-wall components, HyPRPs might participate in cell wall cross-linking.

To test the hypothesis that HyPRPs act as linkers between the cell wall and plasma membrane or interconnect some components of the cell wall, we prepared a modified gene encoding an HyPRP with a completely deleted N-terminal domain (Fig. 1). The truncated gene encoded just the C-terminal domain, which would functionally compete with the native full-length protein for its hypothetical interactor and thus interfere with the potential linker function of HyPRP. However, over-expression of the truncated *HyPRP* gene in tobacco BY-2 lines unexpectedly caused increased cell elongation, and therefore we tested an alternative hypothesis that the C-terminal domain of HyPRPs may function in cell expansion as previously described for a member of the related LTP family (Nieuwland *et al.*, 2005). In subsequent experiments, we analysed the mechanism of HyPRP action and the role of N-terminal domains, whose length and amino acid composition was previously found to be a phylogenetically significant feature (Dvořáková *et al.*, 2007). In addition to the functional analysis of *HyPRPs* in cell cultures, we also studied their role *in planta* through analysis of the effects of *HyPRP* over-expression on potato plant phenotype and morphogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of constructs for modulation of HyPRP expression

Gene constructs were prepared for the over-expression of *St7* and *Nt1* genes and modified *St1* (*MSt1*) and *Nt1* (*MNt1*) genes with deleted sequences coding for N-terminal proline-rich domains. All sequences were amplified using PCR (for primer sequences, see Supplementary Data Table S1, available online) from genomic DNA, isolated according to the procedure of Shure *et al.* (1983). Alternatively, we used RT-PCR with oligo-dT₂₃ primer and RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, Canada) according to the manufacturer's instructions, with total RNA according to Stiekema *et al.* (1988). The modified *St1* (*MSt1*) and *Nt1* (*MNt1*) genes with deleted sequences coding for N-terminal proline-rich domains consist only of signal sequences and sequences of C-terminal domains. The two separately amplified parts were connected using PCR with specific primers with short sequence extensions. PCR products were cloned into the pDrive cloning vector (Qiagen PCR Cloning kit; Qiagen,

Hilden, Germany) using TA cloning, or into the vector pBluescriptII KS+ (Fermentas). The final gene constructs/genes were inserted into the binary vector pCP60 (provided by Dr P. Ratet, ISV-CNRS, France; Bolte *et al.*, 2004) between the 35S promoter and nopal synthase terminator. All constructs were sequenced to verify accuracy.

Cultivation and transformation of plant material

Potato plants (*Solanum tuberosum*) 'Désirée' were cultured *in vitro* on LS medium (Linsmayer and Skoog, 1965) with 3% (w/v) sucrose. Plants were cultivated in 16 h/8 h light/dark regime at 120 W m⁻², propagated through apical or nodal cuttings, and subcultured every 4–5 weeks. Leaves of 4-week-old potato plants were transformed according to Dietze *et al.* (1995) using *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58C1 with plasmid pGV2260; Deblaere *et al.*, 1985) carrying the binary vector pCP60 with kanamycin resistance and a specified HyPRP gene insert.

Tobacco BY-2 cell culture (*Nicotiana tabacum* 'Bright Yellow'; Nagata *et al.*, 1992) was grown in modified MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 3% (w/v) sucrose. Cell lines were cultured either in a suspension culture in liquid MS medium with continuous shaking, or in the form of calli on MS media solidified with 0.8% (w/v) agar in the dark at 26 °C. Suspension cultures were subcultured every 7 d by transferring 1.5 mL of the suspension culture into 30 mL of the fresh MS medium; calli were sub-cultured every 3–4 weeks. Transformation of tobacco BY-2 cells as well as potato plants was performed using the same strain of *Agrobacterium tumefaciens* carrying the binary vector pCP60 harbouring different HyPRP genes. Exponential cell suspension (3–4 d after subculturing) was filtered and the cells were resuspended in 30 mL of fresh MS medium. Fifteen microlitres of 40 mM acetosyringone were added to the suspension and thoroughly mixed using a 10 mL pipette with the tip cut off. Three millilitres of *Agrobacterium* suspension were then added to the cell suspension and co-cultivated for 3 d in the dark at 26 °C. The cells were then washed with 300 mL of 3% (w/v) sucrose and 100 mL of MS medium supplemented with 100 mg L⁻¹ cefotaxime. Finally, the cells were resuspended in 2–3 mL of liquid MS medium containing cefotaxime and evenly spread onto a Petri dish with solid MS medium containing cefotaxime plus 50 mg L⁻¹ kanamycin. Transformed cells were cultivated for 3–4 weeks in the dark at 26 °C, and the calli which grew were transferred onto fresh MS medium with the same antibiotics. Antibiotics were used only during the first 4–5 weeks after transformation. Suspension cultures used for the phenotype assessment were cultured in the absence of antibiotics.

Evaluation of the phenotype of transgenic tobacco BY-2 cell lines

Images documenting the phenotype of transformed cell lines were obtained using a fluorescent microscope (Olympus Provis AX70 or Olympus BX51), grabbed with a digital TV camera (Sony DXC-950P; Sony Corp., Tokyo, Japan) and digitized with Lucia image analysis software (version 5, Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). The length of the cells analysed was measured using Lucia software.

Evaluated lines were analysed without knowing their identity. For each cell line, three to five randomly selected frames with a total of 150–250 cells were obtained. The length of all cells in the frames was determined as the maximum dimension in the longitudinal axis of the cell. The mean value of cell length of the wild-type tobacco BY-2 cell control was calculated from the dataset obtained from three individual control lines (C1, C2, C3) to account for internal variability of the cell cultures. Differences between cell lines transformed with each HyPRP gene were tested for significance using statistical software NCSS version 2000 and GLM ANOVA. A variant (BY-2, GFP, St7, Nt1, Mnt1) was used as a fixed factor in the model and a single evaluated line as nested factor. The significance level for testing of zero hypothesis was selected at 5% ($\alpha = 0.05$). Length differences of individual transgenic lines in the experiment in Fig. 2A were tested by the Mann–Whitney *U* test ($\alpha = 0.05$). Cell lines were considered as longer or shorter when significantly different from all three wild-type control lines C1–C3.

For protoplasts preparation, 3- to 5-d-old cells in exponential phase of growth were treated with 1% (w/v) cellulase 'Onozuka' R-10 (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan) and 0.1% (w/v) pectolyase Y-23 (Kyowa Chemical Products Co., Osaka, Japan) in 0.45 M mannitol and incubated at 24 °C for 3–4 h. The proportion of round-shaped protoplasts and the total cell number were determined at 30-min intervals (a total of 400–700 cells in each interval).

For plasmolysis experiments, cells in exponential phase were incubated in 0.45 M or 0.6 M mannitol for 10 min. To evaluate shrinkage of the protoplast, the cells were stained with fluorescein diacetate (FDA) and calcofluor white to identify the protoplast and the cell wall, respectively (Supplementary Data Fig. S1), and their projected areas were obtained by fluorescence microscopy at $\times 200$ magnification. The projected areas were detected as an intensity level threshold in the blue channel for the whole cell (calcofluor-labelled cell wall) and the green channel for the protoplast (FDA label), both manually adjusted to accurately cover the observed area (software Lucia version 5.0).

Evaluation of expression patterns of HyPRP genes

Expression of HyPRP genes was evaluated by semi-quantitative RT-PCR using total RNA isolated from the upper leaves and roots of potato plants 'Désirée' (4-week-old plants grown *in vitro*) and from tobacco BY-2 cell suspensions in exponential phase (3 d after subculturing) using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription with oligo-T₂₃ primer and RevertAidTM M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas) was performed starting with equal amounts of RNA (1 μ g) pretreated with DNase I according to the manufacturer's instructions. For primers used in PCR, see Supplementary Data Table S1 or Dvořáková *et al.* (2007). PCR products were separated on agarose gels in the presence of ethidium bromide or GelRedTM nucleic acid stain (Biotium, Hayward, CA, US). Gel images were taken in transmitted UV light using an Olympus C-4040 digital camera.

Nucleotide sequence data can be found in Solanaceae Genomics Network under accession numbers SGN-U268850

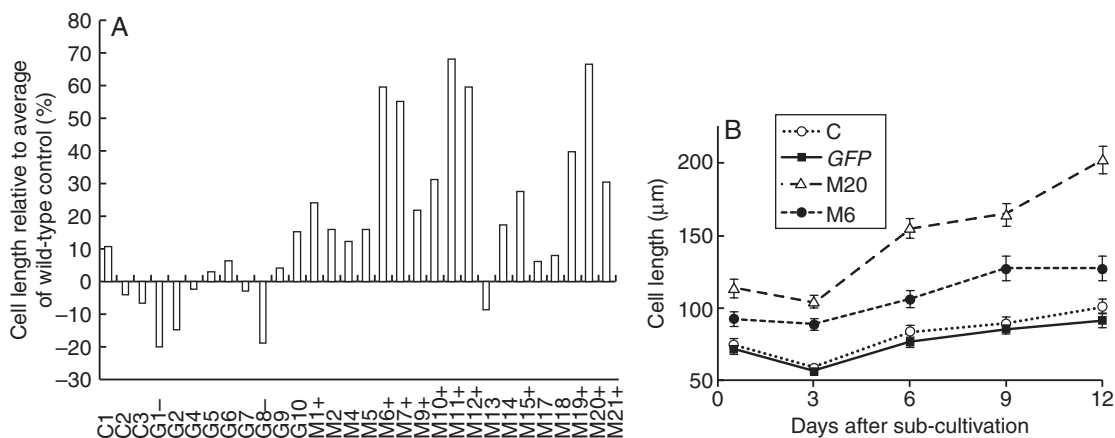


FIG. 2. Cell elongation in transgenic tobacco BY-2 lines harbouring the *MNt1* gene. (A) Average cell lengths in randomly selected lines transformed with the *MNt1* and *GFP* genes are compared with the mean value of 86 µm in wild-type BY-2 cells. Cell lengths on the 7th day of the sub-cultivation interval are compared (3 weeks after the transfer to liquid media). C1–C3, Wild-type BY-2 control lines; G1–G10, lines transformed with the *GFP* gene; M1–M21, lines transformed with the *MNt1* gene. Transgenic lines are considered as longer (indicated with +) or shorter (–) than controls when significantly different from the average cell lengths of all three wild-type lines C1–C3 by Mann–Whitney *U* test ($\alpha = 0.05$). (B) Average cell lengths (\pm s.e.) of selected lines during 7-d sub-cultivation interval and prolonged stationary phase up to the 12th day. Abbreviations: C, wild-type BY-2 control line; *GFP*, cell line transformed with the *GFP* gene; M20 and M6, representative cell lines transformed with the *MNt1* gene.

(*St1*), SGN-U272247 (*St7*) and in GenBank under accession number JF803736 (*Nt1*).

RESULTS

Gene selection and preparation of HyPRP constructs

Full-length *HyPRP* genes were isolated from potato (*St1* and *St7*) and from tobacco genomic DNA (*Nt1*; Fig 1; for protein sequence see Supplementary Data Table S2). *St1* and *Nt1* genes encode highly similar orthologues belonging to the subgroup of conserved C-type HyPRPs that are characterized by a long, partially hydrophobic N-terminal domain and a broad expression pattern. The C-type subgroup of HyPRPs is represented by two members in potato (Dvořáková et al., 2007). By contrast, *St7* is a representative of HyPRPs with short N-terminal domains (about 14 members in potato; Dvořáková et al., 2007) and its expression is restricted to roots. To study the HyPRP function, we prepared modified genes *MSt1* and *MNt1* encoding the C-type HyPRPs with a completely deleted N-terminal domain (Fig. 1 and Supplementary Data Table S2). Cell lines over-expressing the respective *HyPRP* genes are referred to in the text as *Nt1*, *MNt1*, *St1*, *MSt1*, *St7* lines.

Over-expression of the modified *Nt1* gene (*MNt1*) in tobacco BY-2 cells

The modified *MNt1* protein lacking the N-terminal domain was expected to compete with the endogenous wild-type *Nt1* for a hypothetical interactor. The phenotype of BY-2 cells transformed with *MNt1* driven by the CaMV 35S promoter was compared with those transformed with the *GFP* gene to evaluate potential effects of the transformation procedure and the initial cultivation on kanamycin selective media. In addition, non-transformed wild-type cell lines derived from calli were used to assess the internal variability of tobacco BY-2 suspensions and the effect of callus-to-suspension transition.

In total, 18 randomly selected *MNt1* lines were compared microscopically with nine *GFP* control lines and three lines of the wild-type controls. The only phenotypic alteration observed in the *MNt1* lines was an increase in cell length, which was significant in 11 out of the 18 lines (Fig. 2A). The average cell length was increased by up to 60 % compared with the mean length of 86 µm in wild-type controls. The difference in the cell length was obvious during the whole 7-d sub-cultivation interval as well as during the prolonged stationary phase up to the 12th day (Fig. 2B). The cell width and other morphological parameters of the *MNt1* cells did not significantly differ in the majority of the lines (Fig. 3).

To evaluate potential correlation between cell elongation and *MNt1* expression, we performed semi-quantitative RT-PCR in two sets of lines; characterized with the most-elongated cells (M6, M7, M11, M12 and M20) and the least-elongated cells, comparable with wild-type BY-2 cells (M2, M4, M13, M17 and M18). Surprisingly, *MNt1* transcript levels were relatively high in practically all lines and did not correlate with the cell length (Supplementary Data Fig. S2). Interestingly, the two contrasting sets of *MNt1* lines differed in the expression of their resident native *Nt1* gene, so that the lines with relatively short cells seemed to have down-regulated expression of the *Nt1* gene, whereas in four out of five cases the lines with long cells kept the *Nt1* transcript at higher level. Thus, the cell elongation appears to correlate with *Nt1* expression or theoretically the sum of both genes, indicating that the effects of the truncated and native gene were additive rather than *MNt1* competitively inhibiting the function of *Nt1*.

Over-expression of HyPRP genes with short and long proline-rich domains in tobacco BY-2 cells

Considering that the truncated *MNt1* yields a single 8CM motif, we analysed more broadly the impact of HyPRPs and their N-terminal domains on cell elongation. Constructs with two other *HyPRP* genes were prepared and introduced into tobacco

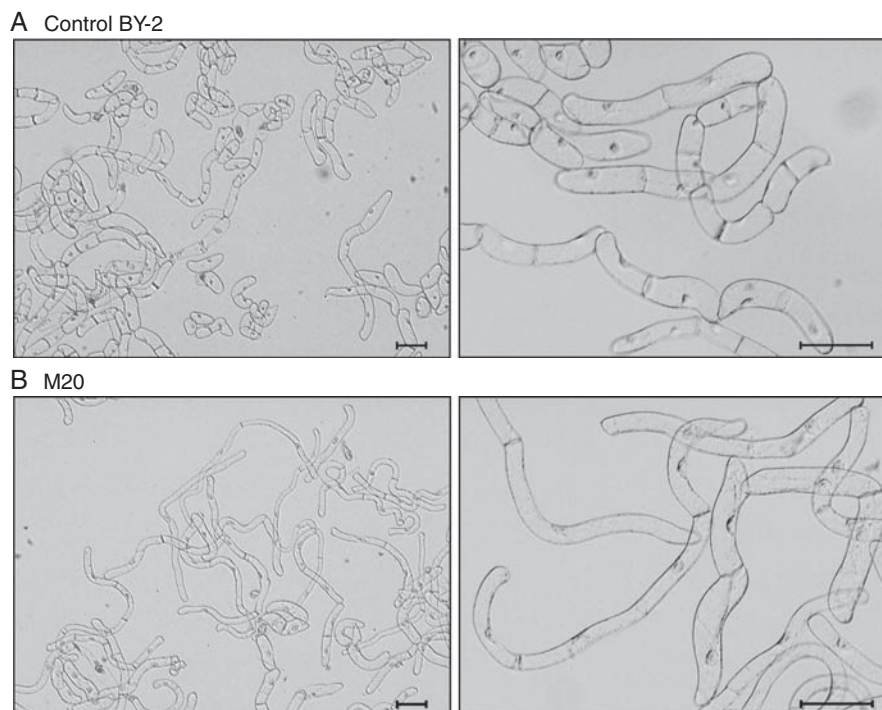


FIG. 3. Morphology of wild-type tobacco BY-2 cells and cells harbouring the *MNt1* gene (M20). (A) Suspensions of BY-2 and (B) *MNt1* cultures on the 6th day of the sub-cultivation interval at two different magnifications. Bright field. Scale bars = 100 μm .

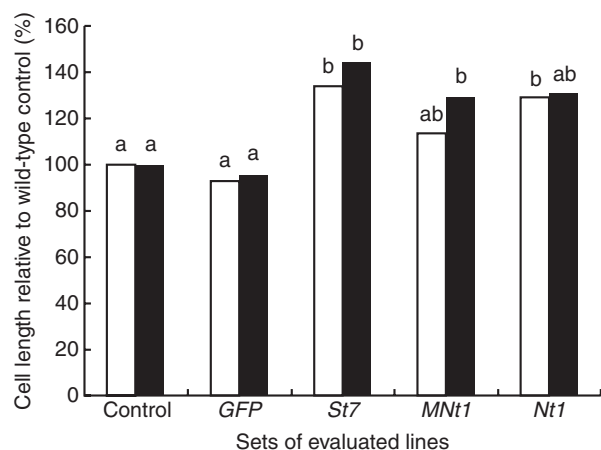


FIG. 4. Average cell length of transgenic and control tobacco BY-2 lines. Cell length in the stationary phase of growth was measured in two independent experiments as indicated by black and white columns. Control, the means of four wild-type tobacco BY-2 lines; *GFP*, the means of six independent lines transformed with the *GFP* gene; *St7*, *MNt1* and *Nt1*, the means of five to ten independent lines transformed with genes encoding HyPRPs with different N-terminal domains (*St7*, short; *Nt1*, long; *MNt1*, deleted). Cell lengths are expressed as a percentage of the average cell length in wild-type BY-2 lines (= 100%). Data columns indicated by different letters are significantly different at $\alpha = 0.05$ within the repetition; columns that share the same letter do not differ significantly.

BY-2 cell lines: wild-type tobacco *Nt1* gene encoding 262 amino acids in the N-terminal domain, and potato *St7* gene encoding a short, 28 amino acids N-terminal domain (Fig. 1; Supplementary Data Table S2). For cell length measurements, ten newly transformed *MNt1* lines, four wild-type BY-2 cell sub-lines and six newly generated *GFP* lines were used as controls.

The average cell lengths of ten randomly selected *Nt1* lines, five *St7* lines and ten *MNt1* lines were significantly larger than the cell lengths of *GFP* and wild-type control lines in at least one of two independent measurements (Fig. 4). No statistically significant differences were found when comparing the lines transformed with the three different *HyPRP* genes, indicating that the effects of all three tested genes were comparable. The enhanced elongation of cells transformed with the *HyPRP* genes seen in the suspension culture during the stationary phase of growth was consistently accompanied by reduced fluidity, which was evident when shaking or pipetting the cultures. However, there was no significant difference in the dry weights of the control and *HyPRP* lines (data not shown). The calli over-expressing *HyPRP* genes grew larger than those transformed with the *GFP* gene. This was observed, both directly after transformation and after cloning individual cells from four lines over-expressing any of the three *HyPRP* genes (see examples in Fig. 5). The average callus areas of four tested lines were significantly larger than the mean callus area of the *GFP* transformed line (*GFP* = 100%; *Nt1*, 198%, *MNt1*, 218%; *St7*-1, 280%; *St7*-2, 144%; $n = 219-325$). The differences in callus size seemed to be primarily related to cell size. The average cell length of twelve 10-d-old calli obtained by cloning was significantly higher in *St7*-over-expressing cells compared with the *GFP* ones. The average cell lengths were 112.3 μm and 75.0 μm for *St7* and *GFP*, respectively, which corresponds well with the values determined in suspension cultures.

To test for potential changes in the structure and integrity of the cell wall in the *HyPRP*-over-expressing cell lines, *St7*-over-expressing and control cell suspensions in exponential phase of growth were treated with the cell wall-degrading

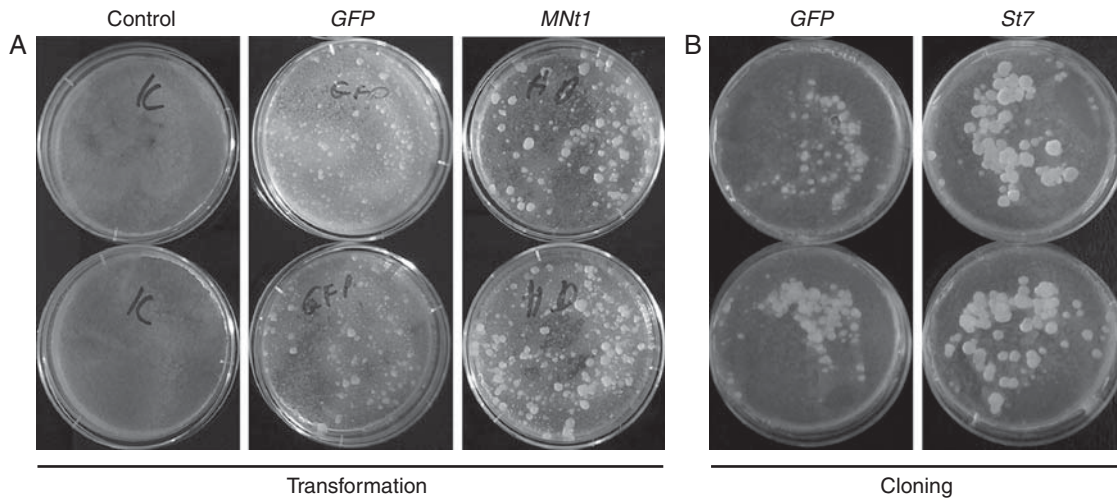


FIG. 5. Growth of transgenic tobacco BY-2 calli after transformation and cloning. (A) Transformation: representative Petri dishes (two per each variant) with calli of BY-2 cells transformed with *GFP* and *MNt1* genes grown on selective media for 4 weeks after transformation (co-cultivation with *Agrobacterium*). (B) Cloning: calli (4 weeks old) forming from individual cells of selected *GFP* and *St7* lines growing on a feeder layer of untransformed BY-2 cells (cloning was performed according to Nocarova and Fischer, 2009).

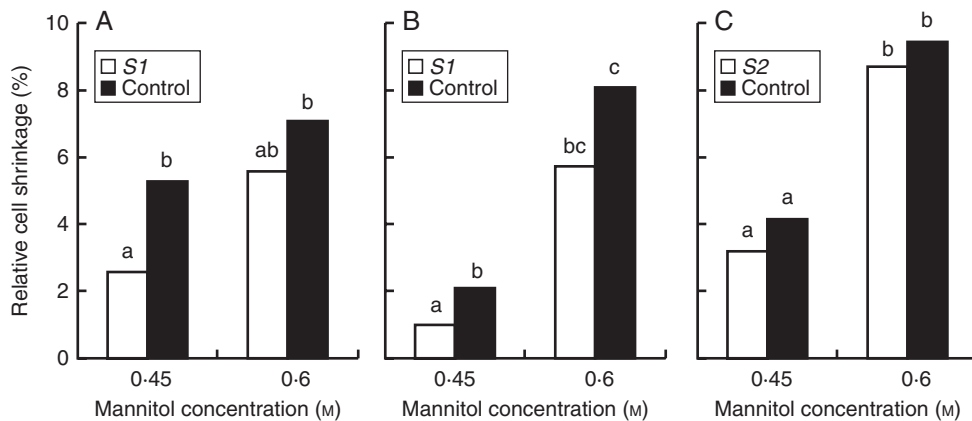


FIG. 6. Protoplast shrinkage of transgenic and control tobacco BY-2 cells after 10-min exposure to 0.45 M and 0.6 M mannitol. Two lines over-expressing the *HyPRP* gene *St7* are compared with wild-type BY-2 control: (A,B) *S1*, (B) *S2*. Protoplast shrinkage was determined by staining the cells with fluorescein diacetate and calcofluor white (Supplementary Data Fig. S1, available online), and using image analysis of the projected areas of the protoplast and the whole cell (details in Materials and Methods). The three graphs represent independent replicates. Data columns indicated by different letters are significantly different at $\alpha = 0.05$ within the replicate; columns that share the same letter do not differ significantly.

enzymes cellulase and pectolyase. In five out of 12 repetitions with three different *St7* lines, the protoplast release from *St7* cells was faster by up to 30% compared with the wild-type controls (see example in Supplementary Data Fig. S3). In the remaining cases, the rate of protoplast formation appeared to be similar to that in the wild-type control, but it was never slower. Despite repeated attempts, the factor responsible for variation amongst repetitions and only occasional observation of a difference in protoplast formation was not identified.

To understand better the mechanism of *HyPRP*-induced cell expansion, we also tested whether cells over-expressing *St7* gene were more or less sensitive to plasmolysis when exposed to a hypertonic solution of 0.6 M mannitol or a near-isotonic solution of 0.45 M mannitol. If *HyPRPs* (*St7*) reduce the rigidity of the cell wall, increased elongation would be accompanied with decreased osmotic potential within the cells. If, in contrast, *HyPRPs* act as linkers between cell wall and

plasma membrane, we would expect enhanced resistance to plasmolysis in over-expressing cells. The extent of plasmolysis in individual cells was determined after staining the protoplasts with FDA and the cell walls with calcofluor white (Supplementary Data Fig. S1). The extent of protoplast shrinkage was determined using image analysis software (for details, see Materials and Methods). In 0.45 M mannitol, the average frequency of plasmolysed cells in two tested *St7* lines was approx. 1.37 times higher than in the wild-type BY-2 line; the ratios between the frequency of plasmolysed cells in *St7* and control lines in the three replicate experiments were 52 : 36%; 32 : 21% and 34 : 30%. The extent of protoplast shrinkage measured under both mannitol concentrations was higher in the *St7* lines, although the difference was not statistically significant in all repetitions (Fig. 6). As expected, the protoplast shrinkage in both cell lines was higher in the hypertonic solution of 0.6 M mannitol (Fig. 6).

To test the effect of altered medium osmolarity on cell extension further, we cultured a selected *HyPRP* line (*MNt1* line M20) and wild-type tobacco BY-2 line in media supplemented with 7% sucrose. During the exponential phase of growth, the high sucrose concentration substantially reduced the cell length in both lines when compared with the normal conditions with 3% sucrose. At the end of the 7-d sub-cultivation interval, *MNt1* cells cultured on 7% sucrose remained significantly shorter by >20% compared with those on normal media (Mann–Whitney *U* test; $P = 0.00$), whereas only a small insignificant difference ($P = 0.43$) was observed between the length of untransformed cells on media with 7% and 3% sucrose. After 9 d of cultivation, about 10% of *MNt1* cells exhibited an anomalous triangular shape on the media with 7% sucrose, whereas no such cells were observed in the untransformed BY-2 line (Supplementary Data Fig. S4).

Over-expression of HyPRP genes in potato plants

By analogy with the tobacco BY-2 cell lines, potato plants were transformed with the following *HyPRP* genes: *St1* gene with a long N-terminal domain, normally expressed in most organs except mature leaves; modified *St1* gene (*MSt1*) with a deleted proline-rich domain; and *St7* gene with a short N-terminal domain expressed preferentially in roots (Dvořáková et al., 2007; Fig. 1). From 10 to 50 transgenic potato lines were obtained after each transformation. Expression of the introduced genes was confirmed in at least ten lines for each transformation by northern hybridization in the case of *St1* and by semi-quantitative RT-PCR for *MSt1* and *St7* genes (Supplementary Data Fig. S5). Nevertheless, detailed morphological analysis, including the height of plants, leaf size and shape, and root architecture, of the transgenic plants did not reveal any visible changes in response to the ectopic over-expression of any of the three genes under the control of the constitutive 35S *CaMV* promoter.

Since the over-expression of *HyPRP* genes promoted cell elongation in the BY-2 lines, we measured the length of well-defined root cells in the elongation zone 1 cm away from the root tip of *in-vitro*-grown potato plants transformed with the *MSt1* gene. However, the length of cells in transgenic and control plants did not show significant differences (Supplementary Data Fig. S6).

When no change in the morphological characteristics was detected, there remained the possibility that the expression of introduced genes was compensated for by changes in the expression levels of other genes involved in cell extension, namely, endogenous *HyPRP* genes, in a way similar to the situation observed in some transgenic tobacco BY-2 lines (Supplementary Data Fig. S2). Therefore we analysed the expression of 14 potato *HyPRP* genes in roots and young leaves of five selected lines with high expression of the introduced genes (Supplementary Data Fig. S7). However, the expression profiles of the *HyPRP* genes in the transgenic lines and two parallel control plants did not reveal any consistent differences in the transcript levels that would exceed the natural variability of *HyPRP* gene expression.

DISCUSSION

Over-expression of HyPRP genes is likely to promote elongation of tobacco BY-2 cells

The majority of BY-2 lines transformed with the *MNt1*, *Nt1* or *St7* genes exhibited enhanced cell elongation when compared with wild-type BY-2 (Figs 2A, 3 and 4). No such changes were observed in BY-2 lines transformed with an analogous T-DNA carrying the *GFP* gene, which is regarded not to affect the phenotype of transformed plant materials (Seth and Vierstra, 1998). This indicates that the observed phenotypic changes resulted from *HyPRP* over-expression and were not related to the transformation and selection procedure *per se*.

In contrast to our results, Holk and colleagues described enhanced cell expansion in carrot cell cultures with the down-regulated *HyPRP* gene *DC 2-15* and suggested that the protein may be suppressing cell extension (Holk et al., 2002). Since our experiments with over-expression of three different *HyPRP* genes in BY-2 cells consistently promoted cell elongation, we presume that *DC 2-15* either had another specific function or the described phenotypic changes were not directly related to the down-regulated expression of this gene.

Enhanced cell elongation is likely to be the result of cell-wall loosening

The growth of plant cells is generally related to loosening of the cell wall, which allows cell expansion driven by osmotic water uptake (reviewed in Cosgrove, 2005). The enhanced elongation of BY-2 cells over-expressing the *HyPRP* gene *MNt1* was partially compensated for in a medium with increased osmotic potential (7% sucrose; Supplementary Data Fig. S4), which reduced the osmotic gradient between the medium and the cell and, hence, the driving force required for cell extension. Although the high sucrose treatment most likely had pleiotropic effects, the short-time exposure of BY-2 cells to mannitol provided a more reliable comparison of the cell osmotic potentials. Increased elongation of cells over-expressing *HyPRP* gene *St7* was accompanied by enhanced plasmolysis, indicating a possible reduction in the cell osmotic potential. Furthermore, faster release of protoplasts upon enzymatic digestion in some replications suggested that the cell wall of *St7*-over-expressing cells may be, at least transiently, thinner or more plastic compared with untransformed BY-2 cells. Based on these results, we propose that the over-expression of *HyPRP* genes increased the plasticity of the cell wall, thus lowering its ability to resist turgor pressure. Consequently, increased water uptake would increase cell volume and simultaneously reduce the cell osmotic potential.

Loosening of the rigid cell-wall network relies principally on the breaking of hydrogen bonds between cellulose microfibrils and other cell-wall components such as xyloglucans. During acid growth, this loosening is mediated by specialized pH-sensitive non-enzymatic proteins called expansins (reviewed in Cosgrove, 2005). In addition, Nieuwland et al. (2005) demonstrated astonishing participation of non-specific LTPs in pH-independent cell-wall loosening. In contrast to the effect of expansins, expansion of hypocotyls induced by tobacco TobLTP2 remained logarithmic in time, indicating

that LTPs do not initiate new pathways for cell-wall extension but rather facilitate the ongoing extension process (Nieuwland *et al.*, 2005). The presence of an LTP-like 8CM domain in HyPRPs suggests that the mode of HyPRP action is likely to be similar to that observed in LTPs.

The presence of a hydrophobic 8CM-containing domain and a hydrophilic proline-rich domain within a single molecule of a typical HyPRP inspired researchers to suggest that HyPRPs may participate in interconnections between the hydrophobic plasma membrane and the hydrophilic cell wall in a manner similar to glycosylphosphatidylinositol-anchored arabinogalactan proteins (Seifert and Roberts, 2007) or signal-transducing wall-associated kinases that are involved in many morphogenetic processes including cell expansion (Decreux and Messiaen, 2005). Hypothetical reinforcement of the wall-membrane interconnections by HyPRPs was suggested to protect cells against plasmolysis under environmental stresses (Deutch and Winicov, 1995; Goodwin *et al.*, 1996). In contrast to this hypothesis, we observed a higher tendency for plasmolysis in cells over-expressing the *HyPRP* gene *St7*. Thus the protection against environmental stresses mediated by HyPRPs may have a different mode of action, e.g. scavenging of ROS by cysteine residues as suggested by Zhang and Schläppi (2007). Although we cannot exclude the possibility that HyPRPs do indeed interact with both the cell wall and the plasma membrane, the interaction is unlikely to have a significant mechanical function in keeping the two structures in near proximity.

Cell expansion is likely to be mediated by the C-terminal 8CM domain of HyPRP

Over-expression of all three *HyPRP* genes in tobacco BY-2 cells resulted in enhanced cell elongation, with non-significant differences among the genes with different N-terminal domains (Fig. 4). Therefore the facilitation of cell elongation was probably connected with the C-terminal 8CM domains. The mechanism of HyPRP action might be similar to that described for LTPs. The hydrophobic pocket localized inside the 8CM domain of LTPs was suggested to interact with unknown hydrophobic molecule(s) in the cell wall; the charged complex might interrupt hydrogen bonds between celluloses and hemicelluloses, leading to non-hydrolytic loosening of these cross-links (Nieuwland *et al.*, 2005).

HyPRPs, similarly to expansins, consist of two dissimilar domains, although there is no sequence homology between the two protein families. The functional (putative catalytic) domain of expansins mediates disruption of hydrogen bonds in the cell wall, whereas the binding domain allows interactions with cellulose microfibrils. Since the N-terminal domains of HyPRPs are unlikely to be involved in cell-wall loosening, theoretically they may play a role similar to that of the binding domains of expansins, which prevent diffusion of the protein to the walls of neighbouring cells (Cosgrove, 2000). The N-terminal proline-rich domains of HyPRPs may interact with other components of the cell wall in various ways that were already hypothesized in Dvořáková *et al.* (2007), but experimental data are missing. The N-terminal domains of Nt1 and St1 contain AP, SP and TP dipeptides. These motives are typically associated with arabinogalactan

proteins and are glycosylated with arabinogalactan polysaccharides (Showalter *et al.*, 2010) that could mediate multiple interactions with other cell-wall components. Lys-Pro motifs of some HyPRPs may interact with acid cell-wall polymers such as pectins (Kieliszewski and Lamport, 1994). Serine- and threo9-rich sequences may allow the formation of hydrogen bonds between hydroxyl groups of these amino acids. N-terminal domains with high content of hydrophobic and aliphatic amino acids may participate in the formation of hydrophobic interactions as already hypothesized in Dvořáková *et al.* (2007). Some HyPRP may be also covalently cross-linked with other proline- or hydroxyproline-rich proteins through amino acid motifs Val-Tyr-Pro-Lys or Val-Pro-Tyr-Lys (present in St1 and Nt1 proteins), which are closed to the Pro-Val-Tyr-Lys motif present in some expansins where such motifs are supposed to participate in intermolecular cross-linking (De Loose *et al.*, 1991; Kieliszewski and Lamport, 1994). The type of N-terminal domain interaction is likely to be based mainly on its amino acids composition and motifs (see detailed overview of the whole HyPRP family in Dvořáková *et al.*, 2007). Through different types of interaction, the N-terminal domains may theoretically also participate in fine-tuning of the cell-wall extension processes under different conditions or in different cell types.

Cell elongation induced by HyPRP over-expression may be compensated in planta

In contrast to BY-2 cell lines, no phenotypic changes were observed in potato plants over-expressing any of the three *HyPRP* genes *MSt1*, *St1* or *St7*. The lack of phenotypic changes may simply indicate that HyPRP levels are not the limiting factor in cell elongation *in planta*. Alternatively, enhanced HyPRP levels could induce compensatory or feedback regulation, which is generally believed to play an important role in cell-wall function (Humphrey *et al.*, 2007). The complexity of the plant body is much higher compared with the artificial system of individually growing tobacco BY-2 cells or cell files. In line with our observation, there is no report documenting changes in the cell length in intact plants over-expressing *LTP* genes; enhanced elongation was only observed in some cell clusters of the spruce embryogenic culture over-expressing the *LTP* gene *Pa18* (Sabala *et al.*, 2000). Stronger compensatory mechanisms may have lead to effective suppression of undesirable cell expansion in the complex plant body. Such control of cell expansion probably involved players other than HyPRP family members because no direct compensation was observed at the expression levels of any of the 14 *HyPRP* genes analysed.

CONCLUSIONS

Detailed analysis of tobacco BY-2 cells over-expressing *HyPRP* genes with different types of N-terminal domains suggests that C-terminal domains of HyPRPs are involved in cell-wall loosening, thus allowing cell expansion/elongation. The absence of visible phenotypic alterations in *HyPRP*-over-expressing potato plants indicates the presence of compensatory mechanisms ensuring proper cell expansion *in planta*. The mechanism of how HyPRPs act as well as the precise

localization of HyPRPs in the cell wall needs further investigation.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at www.aob.oxfordjournals.org and consist of the following. Fig. S1: representative images of plasmolysed wild-type BY-2 and *St7* cell files stained with FDA and calcofluor white to quantify the protoplast shrinkage. Fig. S2: level of accumulation of transcripts of the resident (*Nt1*) and introduced (*MNt1*) genes. Fig. S3: representative plots of the rate of protoplast release from experiments with a pronounced difference between the untransformed control and *HyPRP* over-expressing line (*St7*). Fig. S4: cell morphology of wild-type BY-2 cells and cells over-expressing the *MNt1* gene cultivated in standard conditions (3% sucrose) and in a medium with 7% sucrose (7%). Fig. S5: level of accumulation of transcripts of the introduced *HyPRP* genes in selected potato lines. Fig. S6: length of cells in the root elongation zone of potato plants grown *in vitro*. Fig. S7: expression of *HyPRP* genes in apical leaves and roots of selected potato plants grown *in vitro* transformed with the *St7* and *MS1* genes. Table S1: primers used for PCR. Table S2: amino acid sequences of the proteins studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Jan Marc for language corrections and two anonymous reviewers for suggesting several smart improvements of the manuscript. Funding was provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LC06004, LC06034, and MSM0021620858) and the Grant Agency of Charles University in Prague (136510).

LITERATURE CITED

- Blanco-Portales R, López-Raéz JA, Bellido ML, et al. 2004. A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Molecular Biology* **55**: 763–780.
- Bolte S, Brown S, Safiat-Jeuemaitre B. 2004. The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rab(mc) is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. *Journal of Cell Science* **117**: 943–954.
- Bouton S, Viau L, Lelièvre E, Limami AM. 2005. A gene encoding a protein with a proline-rich domain (MtPPRD1), revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH), is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination. *Journal of Experimental Botany* **56**: 825–832.
- Cosgrove DJ. 2000. Loosening of plant cell wall by expansins. *Nature* **407**: 321–326.
- Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews* **6**: 850–861.
- Deblaere R, Bytebier B, Degreve H, et al. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene-transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**: 4777–4788.
- Decreux A, Messiaen J. 2005. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant and Cell Physiology* **46**: 268–278.
- De Loose M, Gheysen G, Tire C, et al. 1991. The extensin signal peptide allows secretion of a heterologous protein from protoplasts. *Gene* **99**: 95–100.
- Deutch Ch, Winicov I. 1995. Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein. *Plant Molecular Biology* **27**: 411–418.
- Dietze J, Blau A, Willmitzer L. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). In: Potrykus I, Spangenberg G. eds. *Gene transfer to plants*. Berlin: Springer-Verlag, 24–29.
- Drenth J, Low BW, Richardson JS, Wright CS. 1980. The toxin-agglutinin fold: a new group of small protein structures organized around a four-disulfide core. *Journal of Biological Chemistry* **255**: 2652–2655.
- Dvořáková L, Cvrčková F, Fischer L. 2007. Analysis of the hybrid proline-rich protein families from seven plant species suggests rapid diversification of their sequences and expression patterns. *BMC Genomics* **8**: 412. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-412>.
- Fischer L, Lovas A, Opatrný Z, Bánfalvi Z. 2002. Structure and expression of a hybrid proline-rich protein gene in the *Solanaceae* species, *Solanum brevidens*, *Solanum tuberosum* and *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Plant Physiology* **159**: 1271–1275.
- Gaisteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. 2005. In: Walker JM. ed. *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server: the proteomics protocols handbook*. New York, NY: Humana Press, 571–607.
- Gincel E, Simorre JP, Caille A, Marion D, Ptak M, Vovelle F. 1994. Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data: a new folding for lipid carriers. *European Journal of Biochemistry* **226**: 413–422.
- Goodwin W, Pallas JA, Jenkins GI. 1996. Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **31**: 771–781.
- He C-Y, Zhang J-S, Chen S-Y. 2002. A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicylic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 1125–1131.
- Holk A, Klumpp L, Scherer GFE. 2002. A cell wall protein down-regulated by auxin suppressed cell expansion in *Daucus carota* (L.). *Plant Molecular Biology* **50**: 295–305.
- Humphrey TV, Bonetta DT, Goring DR. 2007. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytologist* **176**: 7–21.
- José-Estanyol M, Puigdomènech P. 2000. Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 97–108.
- José-Estanyol M, Ruiz-Avila L, Puigdomènech P. 1992. A maize embryo-specific gene encodes a proline-rich and hydrophobic protein. *The Plant Cell* **4**: 413–423.
- José-Estanyol M, Gomis-Rüth FX, Puigdomènech P. 2004. The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiology Biochemistry* **42**: 355–365.
- Kieliszewski MJ, Lampert DTA. 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translation codes and phylogeny. *The Plant Journal* **5**: 157–172.
- Linsmayer EM, Skoog F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **18**: 100–127.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S. 1992. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* **132**: 1–30.
- Nieuwland J, Feron R, Huisman BAH, et al. 2005. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *The Plant Cell* **17**: 2009–2019.
- Nocarova E, Fischer L. 2009. Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells: an efficient method to analyze and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biology* **9**: 44. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-9-44>.
- Priyanka B, Sekhart K, Reddy VD, Rao KV. 2010. Expression of pigeonpea hybrid-proline-rich protein encoding gene (*CcHyPRP*) in yeast and *Arabidopsis* affords multiple abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 76–87.
- Sabala I, Elfstrand M, Farbos I, Clapham D, von Arnold S. 2000. Tissue-specific expression of Pa18, a putative lipid transfer protein gene, during embryo development in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology* **42**: 461–478.
- Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR. 2010. A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiology* **153**: 485–513.
- Seifert GJ, Roberts K. 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 137–161.
- Seth JD, Vierstra RD. 1998. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology* **36**: 521–528.

- Shure M, Wessler S, Fedoroff N. 1983.** Molecular-identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* **35**: 225–233.
- Stiekema WJ, Heidekamp F, Dirkse WG, et al. 1988.** Molecular-cloning and analysis of 4 potato-tuber messenger-RNAs. *Plant Molecular Biology* **11**: 255–269.
- Van Damme EJ, Barre A, Rougé P, Peumans WJ. 2004.** Potato lectin: an updated model of a unique chimeric plant protein. *The Plant Journal* **37**:34–45.
- Wu H-M, Zou J, May B, Gu Q, Cheung AY. 1993.** A tobacco gene family for flower cell wall proteins with a proline-rich and cysteine-rich domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 6829–6833.
- Yeats TH, Rose JKC. 2008.** The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science* **17**: 191–198.
- Zhang I, Schläppi M. 2007.** Cold responsive EARLI1 type HyPRPs improve freezing survival of yeast cells and form higher order complexes in plants. *Planta* **227**: 233–243.

Sugar-induced endocytosis of plant 7TM-RGS proteins

Nguyen Phan,^{1,*} Daisuke Urano,¹ Miroslav Srba,³ Lukas Fischer³ and Alan M. Jones^{1,2}

¹Department of Biology; University of North Carolina at Chapel Hill; Chapel Hill, NC USA; ²Department of Pharmacology; University of North Carolina at Chapel Hill; Chapel Hill, NC USA; ³Department of Experimental Plant Biology; Faculty of Science; Charles University in Prague; Prague, Czech Republic

Keywords: 7TM-RGS, sugar signaling, endocytosis, *Arabidopsis thaliana*, *Pinus taeda*, tobacco

Abbreviations: 7TM-RGS, seven transmembrane regulator of G protein signaling; AP2, Adaptor-related protein complex 2

Plant cells use sugars mainly as a source or store of energy and carbon skeletons for anabolic reactions and for osmotic regulation. The perception of sugars and their responses are rather complex including the heterotrimeric G protein pathway and a seven-transmembrane RGS molecule. Previously, we found that endocytosis of the 7TM-RGS leads to sustained activation of the G protein pathway in the genetic model *Arabidopsis*. Here we show that other plants possess similar endocytosis systems of the 7TM-RGS proteins. A phosphorylation site essential for the endocytosis is well conserved in land plant 7TM-RGS proteins. In addition, conifer and tobacco 7TM-RGS proteins are internalized in response to sugar. These results indicate a universal mechanism to activate G signaling by endocytosis in plant cells that have 7TM-RGS proteins.

Sugars are an essential energy source for cells of most organisms. The recognition and signaling processes of sugars are crucial systems that allow plants to know their energy level and decide their developmental strategies. Heterotrimeric G proteins are involved in sugar perception and responses in *Arabidopsis*.¹⁻⁴ Sugars affect the G protein pathways by affecting AtRGS1 (*Arabidopsis thaliana* regulator of G signaling 1). RGS proteins promote the deactivation step of G protein by accelerating GTP hydrolysis of G α subunits.⁵⁻⁷ The mammalian RGS molecules are soluble proteins that act on G α subunits to turn G signaling off. AtRGS1 has an atypical domain architecture, comprised of a 7TM receptor-like domain and a C-terminal RGS domain.^{1,4,8}

Recently, we showed that sugar activates the G α subunit, causing the subsequent release of G $\beta\gamma$ subunits to recruit a WNK [with no lysine (K)] kinase to phosphorylate AtRGS1. Phosphorylation causes AtRGS1 to internalize (Fig. 1A; arrows).⁴ Single-molecule imaging at the plasma membrane of sugar-treated AtRGS1-YFP seedlings revealed AtRGS1 endosomes forming at the plasma membrane periphery (Fig. 1A). Endocytic internalization motifs have been shown to be involved with clathrin-dependent internalization from the plasma membrane.^{9,10} It is likely that these endocytic compartments are clathrin-dependent.^{11,12} Here we provide evidence that sugar activation of G signaling by 7TM-RGS occurs widely in the plant kingdom.

Among vascular plants, one or two 7TM-RGS genes are found in current sequenced genomes except in the cereals and

lower-plants.⁸ Plant RGS proteins have a tyrosine-based Yxx Φ endocytic motif (in which x is any residue and Φ is a bulky, hydrophobic residue) and multiple serine phosphorylation sites preserved among the plant species (Fig. 1B and 2A). The tyrosine endocytic motif is known to bind to the μ 2 subunit of the AP2 clathrin adaptor protein,¹² and structural studies have shown that the spacing between the Y and Φ residues is crucial.^{11,12} The plant RGS protein tyrosine motif is YxxF (Fig. 1B). Phosphorylation at the C-terminal is conserved as well. The Brassica species have conserved phosphorylation sites in the C-terminal tail at Ser428, Ser435 and Ser436⁴ (Fig. 2A). The aligned 7TM-RGS sequences show that the Ser435 is the sole phosphorylation site conserved among all plant species suggesting that Ser435 is the critical phosphorylation site for glucose-induced responses and internalization.

To test if other plant 7TM-RGSs internalize with glucose treatment, and if Ser435 is sufficient to initiate 7TM-RGS endocytosis, we cloned 7TM-RGS genes from a conifer and a tobacco and tested sugar-induced internalization (Fig. 2B and C). *Pinus taeda* (Pt) RGS1 was tagged with YFP and transiently expressed in *Arabidopsis* seedlings prior to sugar treatment. Like *Arabidopsis* AtRGS1, PtRGS1 was localized on the plasma membrane and was internalized by D-glucose treatment (Fig. 2B). Figure 2C shows that in Tobacco BY2 cells, which are maintained in a media with high sugar content (initially 3% sucrose), the stably expressed GFP-tagged *Nicotiana tabacum* (Nt) RGS1 can be

*Correspondence to: Nguyen Phan; Email: complexities@gmail.com

Submitted: 11/06/12; Accepted: 11/06/12

<http://dx.doi.org/10.4161/psb.22814>

Citation: Phan N, Urano D, Srba M, Fischer L, Jones A. Sugar-induced endocytosis of plant 7TM-RGS proteins. *Plant Signal Behav* 2013; 8:e22814; PMID: 23154506; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.22814>.

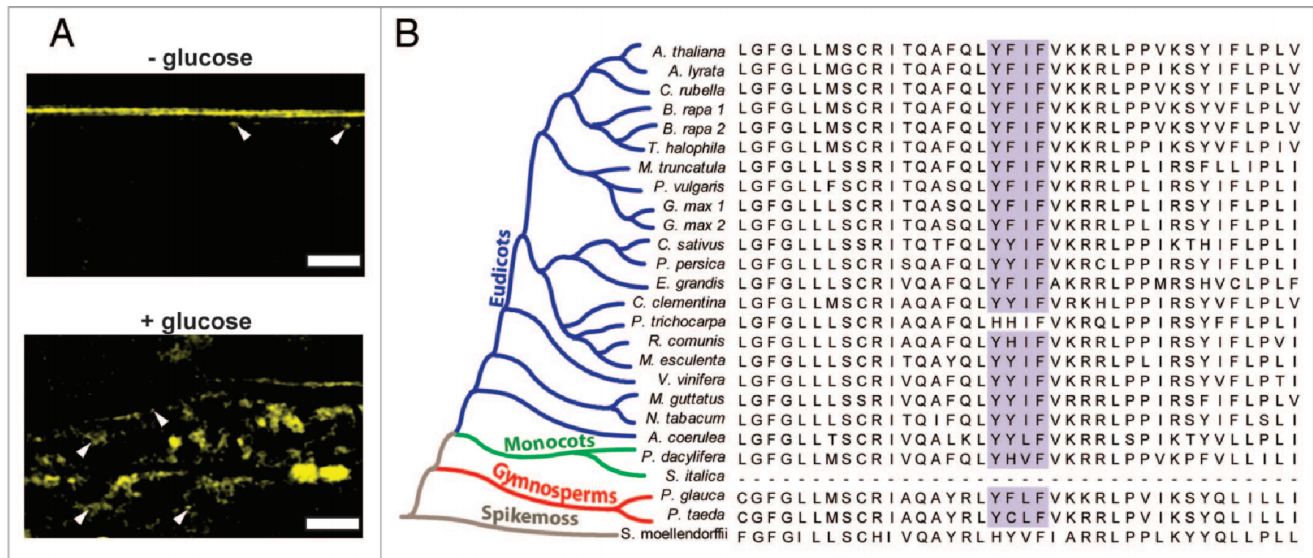


Figure 1. Formation of RGS-containing endosomes. **(A)** Super resolution image of AtRGS1 endosomes Arabidopsis hypocotyl epidermal cells forming at the plasma membrane periphery. Seedling expressing AtRGS1-YFP was treated with 6% glucose followed by 4% paraformaldehyde fixation prior to imaging by Super-resolution Structured Illumination Microscopy (SR-SIM; Zeiss). Arrows show endosomal structure near the plasma membrane in punctae (top) or punctae and clusters (bottom). Scale bar = 5 μ m. **(B)** Sequences for RGS proteins were obtained from a previous research⁸ and Phytozome 8.0 (<http://www.phytozome.net/>). The sequences were aligned with ClustalW implemented in MEGA 5.0.¹³ The N-terminal sequence 93–130 of *Arabidopsis thaliana* RGS1 is compared with other species. The tyrosine Yxx Φ endocytic motif is highlighted.

seen at the cell plate/border between two adjacent cells (arrows) and in the vacuole targeted for degradation (left). It is assumed that constant internalization caused by the high sugar content eventually leads to accumulation of the GFP-tagged proteins into the vacuole (Fig. 2C, left). To support the assumption, NtRGS1 expressing in BY2 cells was restored to the plasma membrane after 2 d starvation in media without sucrose (Fig. 2C, right). These analyses support the conservation of 7TM-RGS internalization by glucose.

The 7TM-RGS in *Arabidopsis* internalizes as a response to sugar and its internalization to activate G signaling. Here we showed that this mode of G protein activation is conserved widely in the plant kingdom.

References

- Chen JG, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, et al. A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* 2003; 301:1728–31; PMID:14500984; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1087790>.
- Chen JG, Jones AM. AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol* 2004; 389:338–50; PMID:15313575; [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)89020-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(04)89020-7).
- Booker KS, Schwarz J, Garrett MB, Jones AM. Glucose attenuation of auxin-mediated bimodality in lateral root formation is partly coupled by the heterotrimeric G protein complex. *PLoS One* 2010; 5:5; PMID:20862254; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012833>.
- Urano D, Phan N, Jones JC, Yang J, Huang J, Grigston J, et al. Endocytosis of the seven-transmembrane RGS1 protein activates G-protein-coupled signalling in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* 2012; 14:1079–88; PMID:22940907; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2568>.
- Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:795–827; PMID:10966476; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.795>.
- Turcotte M, Tang W, Ross EM. Coordinate regulation of G protein signaling via dynamic interactions of receptor and GAP. *PLoS Comput Biol* 2008; 4:e1000148; PMID:18716678; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000148>.
- Lambert NA, Johnston CA, Cappell SD, Kuravi S, Kimple AJ, Willard FS, et al. Regulators of G-protein signaling accelerate GPCR signaling kinetics and govern sensitivity solely by accelerating GTPase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:7066–71; PMID:20351284; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0912934107>.
- Urano D, Jones JC, Wang H, Matthews M, Bradford W, Bennetzen JL, et al. G protein activation without a GEF in the plant kingdom. *PLoS Genet* 2012; 8:e1002756; PMID:22761582; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002756>.
- Koenig JA, Edwardson JM. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18:276–87; PMID:9277131.
- Takei K, Haucke V. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol* 2001; 11:385–91; PMID:11514193; [http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02082-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02082-7).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Work in the Jones Lab is supported by grants from the NIGMS (R01GM065989), DOE (DE-FG02-05er15671), and NSF (MCB-0723515 and MCB-0718202). The Division of Chemical Sciences, Geosciences, and Biosciences, Office of Basic Energy Sciences of the US Department of Energy funded technical support in this study. Fischer Lab is funding by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 0021620858) and Charles University in Prague (GAUK 136510, SVV 265203/2012).

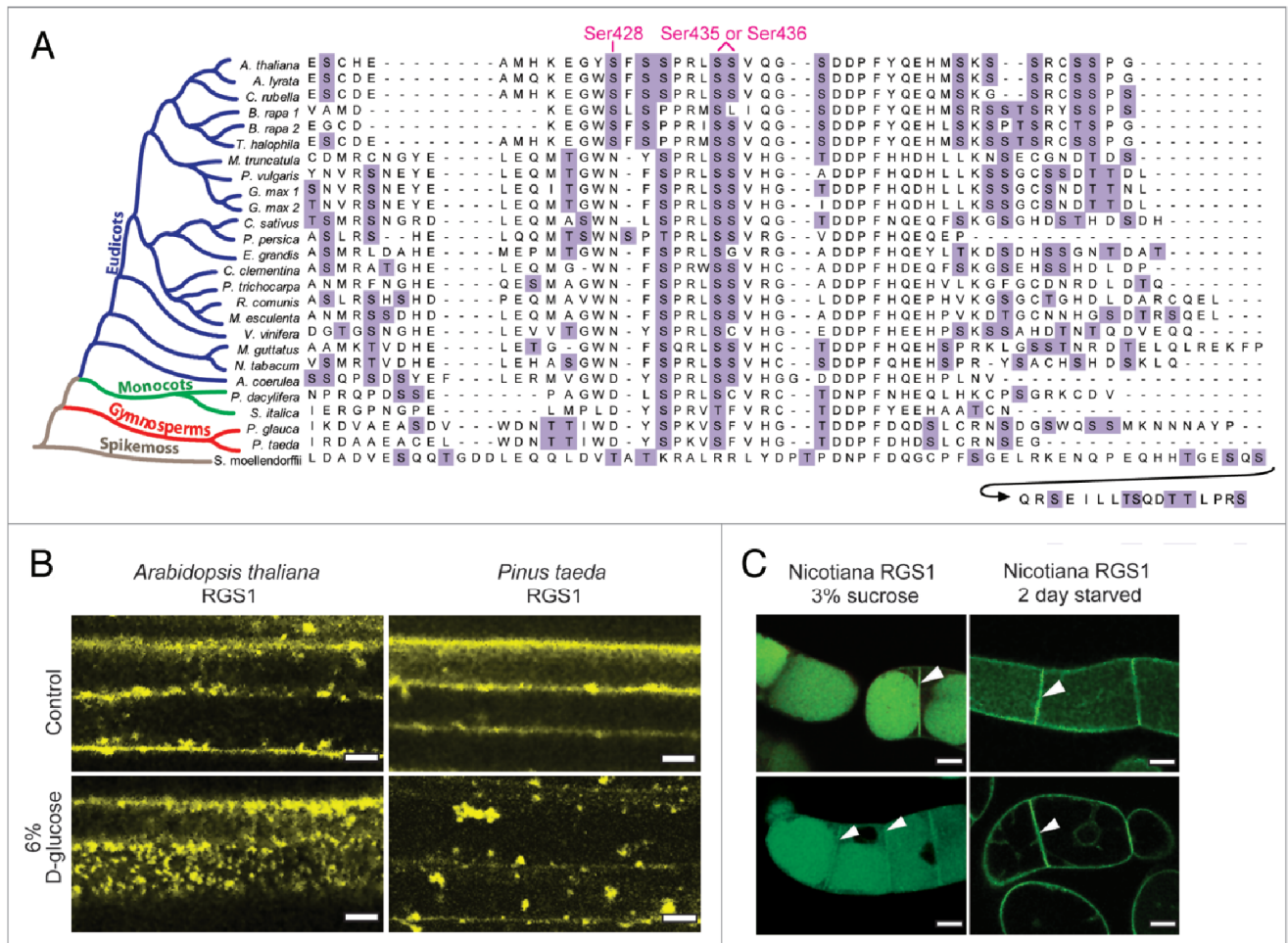


Figure 2. Endocytosis of eudicot and gymnosperm 7TM-RGS proteins. (A) Sequences for RGS proteins were aligned with ClustalW. The carboxyl-terminal sequences (416–459 of *A. thaliana* RGS1) are shown with phylogenetic relationship of species. Highlighted are Tyr, Ser and Thr residues. (B) YFP-tagged proteins for *Arabidopsis thaliana* AtRGS1 (full length, 1–459 aa), and *Pinus taeda* PtRGS1 were transiently expressed in *Arabidopsis* seedlings followed by 30 min of treatment with 6% D-glucose prior to imaging. Scale bar is 10 μm . (C) Tobacco BY2 cells expressing GFP-tagged *Nicotiana tabacum* RGS (two sets—top and bottom rows) grown on 3% sucrose (left) and starved of glucose (right). Arrow shows areas of strong expression. Scale bar = 20 μm .

Practical guidelines for the characterization of tobacco BY-2 cell lines

M. SRBA^{1*}, A. ČERNÍKOVÁ², Z. OPATRNÝ¹, L. FISCHER¹

- 1) *Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Experimental Plant Biology, Viničná 5, 128 44 Praha 2, Czech Republic*
- 2) *Charles University in Prague, Faculty of Science, Institute of Applied Mathematics and Information Technologies, Albertov 6, 128 43, Praha 2, Czech Republic*

* Author for correspondence; e-mail: miroslav.srba@natur.cuni.cz

Abstract:

Plant cell lines represent useful models in plant cell biology. They allow simple analysis of the effects of various factors including modulated gene expression at cellular and subcellular level. Tobacco BY-2 cell line is a favored model due to its high proliferation rate, capability of effective synchronization and accessibility to transformation. Relatively high uniformity of BY-2 cultures allows morphological phenotyping and assessment of growth parameters like mitotic index, viability or cell density. Here we review already published and newly introduced optimized guidelines to carry out reliable, reproducible and efficient characterization of BY-2 cultures; from suggestions of appropriate methods to acquire primary data, to proper statistical treatment and biological interpretation. The presented experimental data demonstrate the extent of natural variability and the effect of initial cell density on various cell culture features. Supportive equations allow to estimate some derived phenotypic parameters like cell cycle duration or fresh biomass of the culture and to determine the size of data sets for reliable documentation of certain phenotypic change. The optimized protocols and accompanying discussion of weak points of different approaches should serve as a practical guide for both beginners and experienced researchers working on BY-2 cells.

Keywords

cytology, functional genomics, transgenic plant cell lines, plant cell phenotyping

Abbreviations

CV – coefficient of variation
DIC – differential interference contrast microscopy
FDA – fluorescein diacetate
SBI – subculture interval
SD – standard deviation
VIA – viability
WT – wild type

Introduction

Effective exploitation of the extensive volume of plant genomic data depends on its proper assessment with appropriate phenotypic markers. Therefore huge effort has been put to uncover the relationship between genotype and phenotype. Various large-scale procedures of plant phenotyping have been developed recently to be used for multifactorial, rapid and objective evaluation of complete plant organisms (Pieruschka and Poorter 2012). Unfortunately, even the best documentation of the “whole plant body” responses may not be sufficient to mechanistic interpretation that often requires understanding the behavior of individual cells forming plant tissues and organs. For this reason plant cell lines are used as alternative experimental models in various studies (Orchard *et al.* 2005, Richard *et al.* 2001, Schaul *et al.* 1996; reviewed in Sato 2013, Seifertova *et al.* 2014). Cell lines offer the possibility of non-invasive characterization and evaluation of various cellular parameters; however, the approaches to their phenotyping have not been well established.

Phenotyping of the majority of plant cell lines is often complicated or practically impossible due to their high cell variability and formation of cell aggregates. One of the first more widely used cell lines with suitable morphological features was started in 1967 from the pith explants of *Nicotiana tabacum* cv. ‘Virginia Bright Italia’ and called VBI-0 (Opatrný and Opatrná 1976, Opatrný *et al.* 2014). However, the strong need for a precise cultivation regime complicated the routine use of the VBI-0 cell line. Later on, it was replaced by the more plastic and phenotypically similar tobacco cell line BY-2 (Nagata *et al.* 1992), which was originated more than 40 years ago from seedlings of *Nicotiana tabacum* cv. ‘Bright Yellow 2’ and gradually became one of the basic plant cell models. It exhibits extreme spontaneous friability of cell files and absence of cell aggregates, consequently allowing direct observation of individual relatively homogenous cells (Nagata *et al.* 1992, Opatrný *et al.* 2014).

BY-2 cells, as well as VBI-0 cells, are cytokinin-autonomous and auxin-dependent, requiring media supplemented with 2,4-D as the favoured auxin (Nagata *et al.* 1992, Orchard *et al.* 2005). The average cell density of the standard BY-2 suspension culture ranges between 10^5 and 10^6 cells per ml of the culture medium. Due to the enormous multiplication rate, reaching up to 100-fold biomass multiplication per one-week subculture interval, the cell divisions can be synchronized by transient application of various antireplicants or cytoskeletal drugs. The mitotic index in synchronized culture can reach up to 60 - 90 % (Nagata and Kumagai 1999, Kumagai-Sano *et al.* 2004, Kuthanova *et al.* 2008) that allows analysis of

gene expression during the cell cycle (Schaul *et al.* 1996, Sorrel *et al.* 1999, Sorrel *et al.* 2001, Matsuoka *et al.* 2004).

BY-2 cells represent one of the favored cellular models to study various aspects of plant cell physiology (Nagata 2004). In suspension, the cells are easily accessible to various chemical treatments and individual cells or linear cell files are suitable for fluorescent immunocytochemical analyses. These features enabled reproducible results to be obtained, for instance in cytoskeleton analyses (Kutsuma and Hasezawa 2002; Schwarzerova *et al.* 2003, Maisch *et al.* 2009). The cell line also allowed us to study the effects of various factors including plant hormones (Hoffmannova *et al.* 2008) and the toxic metals, such as cadmium (Kuthanova *et al.* 2008) and aluminum (Krtkova *et al.* 2012). BY-2 lines also became an important tool for the functional analysis of various genes at the cellular level although assessment of the effects of gene up or down-regulation is complicated due to high differences and variability in transgene expression in independently transformed lines (Nocarova and Fischer 2009). Therefore, the identification of the phenotypic changes and distinguishing between induced changes and natural variability of the line may not be straightforward (David and Perrot-Rechenmann 2001, Dvorakova *et al.* 2012).

The assessment of the effects of various factors including modulated gene expression on BY-2 cells can be done at various levels; determining changes in cell viability, mitotic activity, cell shape and size, polarity of both cell growth and division and also analyzing various markers of cell differentiation and growth. To utilize this potential, a simple, routine and reliable way for detection and measurement of these phenotypic features is needed. Such an exemplary study was performed on *Arabidopsis thaliana* cell line by Richard *et al.* (2001) demonstrating also reliable biometric approaches. Surprisingly, the reviews devoted to BY-2 cell line (Nagata 2004; Nagata *et al.* 2006) paid only little attention to phenotype assessment.

In order to carry out reliable, reproducible and efficient characterization of phenotypic changes in either transgenic or treated BY-2 cell cultures, it is necessary to use appropriate methods to acquire primary data, to treat them with suitable statistical methods and to interpret the results in a proper manner. Here we summarize basic cytological methods and mathematic procedures suitable for cell line evaluation and accompany them with potential weak points of individual approaches and special suggestions optimized for BY-2 line. The instructions for measurement and evaluation of physiological and morphological parameters are based on our long-term experience with diverse transgenic BY-2 lines and lines treated with various compounds. We provide suitable methodological approaches for assessment of the key phenotypic parameters and guidelines to estimate minimal necessary size of data sets

for reliable comparisons. Optimization of the experimental design allows evaluation of a sufficient number of variants and repetitions for improved scientific output.

Material and Methods

Cultivation

The cell line BY-2 (Nagata *et al.* 1992) was cultivated in darkness, temperature 27 °C in MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented by 100mg/l K₂HPO₄ and 1 μM 2,4-D. Pyridoxine and nicotinic acid was omitted compared to the original Murashige and Skoog's protocol. The pH value was adjusted to 5.8. The cells were cultured either in liquid medium as a suspension culture or in the form of plated suspension or inoculated pieces of the cell biomass (“*callus* cultures”) on the agar medium. The suspension cultures were subcultured by inoculating 1 ml of previous stationary suspension culture to 30 ml of fresh medium. Cell suspension was aerated by shaking on a horizontal shaker (160 RPM).

Cytology

Viability test was performed by fluorescein diacetate staining (FDA). One μl of staining solution (2 mg of FDA per 1 ml acetone) was added to 2 ml of cell suspension. Labeling of nuclei allowing automatic counting of cells was done using water solution of Hoechst 33342. Staining solution (Hoechst 33342 - 0.05 mg/ml supplemented with Triton X100 - 100 mg/ml to penetrate cell membranes) was added as 10 μl per 1 ml of sample. Density was measured by scanning of Fuschs-Rosenthal counting chamber (see details in Results and discussion). Microscopic images were captured by Olympus BX 51 equipped with camera Apogee Alta U 4000 (resolution 2048 x 2048 px, 16 bit color depth).

Data analysis and statistical treatment

Image analysis was performed by NIS Elements AR v. 3.1. (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). Statistical analysis was performed using NCSS 2000 (NCSS, LLC; Kaysville, Utah USA) or R 2.13.2 (Bell Laboratories, Murray Hill, New Jersey, USA). Specific statistical models of data processing are described in chapters of Results and discussion describing evaluation of each parameter.

Evaluation of dilution effect on growth parameters - experimental design

Experimental suspensions were prepared to a final volume of 36 ml in four initial dilutions (60x = $4.9 \cdot 10^4$ cells/ml, 30x = $1.0 \cdot 10^5$ cells/ml, 15x = $1.9 \cdot 10^5$ cells/ml, 7.5x = $4.1 \cdot 10^5$ cells/ml). Each dilution variant was represented with six flasks. Samples of 1.5 ml were collected on each day. The initial volume was set to maximally imitate standard

cultivation volume of 30 ml despite repeated sampling that reduced the volume from 34.5 ml (after sampling on day 0) to 24 ml on day 7.

Morphological data were based on the measurement of a total number of 75 000 cells, approx. 250 – 600 for each sample. Density data were based on scanning and counting of 6 fields per every replicated flask and day of sampling, covering $8.3 \cdot 10^5$ cells in total.

Morphology measurement was repeated once with 4 replicate flasks for each dilution with comparable results.

Flow-cytometry

Flow-cytometry analysis was performed by Partec CyFlow ML cytometer. Stationary culture of tobacco BY-2 cells were compared to nuclei isolated from well developed leaves of two months old plants of *Nicotiana tabacum* cv. 'Samsun'. Samples were standardized to nuclei of *Solanum pseudocapsicum* leaf isolates.

Results and Discussion

To receive reliable and reproducible data characterizing the phenotype of a particular plant cell line, one needs to understand the conditions and the character of its growth (Sato 2013). During the standard subculture interval (SBI), BY-2 cells are exposed to continually changing conditions – stationary cells are inoculated to a “raw” well-aerated medium full of nutrients. As the cell density increases, the medium is modified by the cells and the amount of nutrients and oxygen decreases. After short initial lag phase the cells start to divide. Cell divisions are accompanied by longitudinal growth that continues even after cessation of the mitotic activity towards the end of the SBI. The final stationary stage results from the depletion of resources and directs the cells towards senescence (during prolonged SBI). The cell size is maximal in the stationary phase when the cell files spontaneously disintegrate (Seifertova *et al.* 2014). The behavior of cells during the SBI is strongly affected by the initial cell density (see also bellow), which should not decrease below a critical level, where growth of the culture is partially or completely inhibited.

The following text provides a fusion of both results and discussion and is divided into three sections. Section A1 introduces measurements of primary parameters e.g. viability, cell length, mitotic index and cell density (reviewed in table 1). Section A2 provides calculations of secondary parameters such as duration of cell cycle or mitosis that are based on the primary data. Differences in evaluated parameters are demonstrated within the subculture interval on an illustrative experimental data obtained with a set of four wild type BY-2 suspensions differing in the initial cell density. Four different inoculum variants induced groups differing in growth dynamics. Such design imitates hypothetical experimental design on phenotyping of treated or transgenic cell lines with altered growth parameters. Our model also demonstrates relation among mitotic activity, cell length and other parameters that are dependent on each other. All parameters were evaluated by procedures described in chapters of A1 and A2 sections. Section B provides recommendations on general experimental design. In addition, special attention is paid to initial cell density, characterization of transgenic BY-2 lines and characterization of BY-2 *calli*.

A1: Assessment of the primary parameters of the cell culture

Viability

Viability of the untreated WT BY-2 cell population exceeds 90 % during the whole standard SBI. The determination of the proportion of dead or viable cells is the routine procedure (Seifertova *et al.* 2014). Viability of cells can be estimated by several cytological approaches with differing degrees of reliability. Dead or viable cells are commonly detected by cytological staining with trypan blue or fluorescein diacetate (FDA). Due to limited reliability of these methods, some authors discussed alternative visual evaluation with DIC microscopy (Widholm 1972). As this approach strongly depends on personal experience and is time consuming, FDA staining (Fig. 1d) can be recommended as reproducible and simple technique for BY-2 cells (Widholm 1972, Nagata *et al.* 1992). Under standard conditions, FDA staining is sufficient approach, but under specific conditions it is advisable first to compare the results obtained from FDA and from other techniques and then to use their combination if the results differ.

Pairwise statistical comparison of viability in two samples can be performed by proportion test (Wang and Chow 2007). A sufficient sample size can be calculated according to equation 1a, derived after Wang and Chow (2007). For example samples of 300 cells are sufficient to demonstrate 5 % difference in viability compared to untreated control with 100 % viability at $\alpha = 0.05$.

Mitotic Index

The mitotic index is counted as a proportion of cells undergoing any phase of mitosis (Fig. 1b). The chromatin can be visualized by fluorescent dyes such as Hoechst 33342 or DAPI. The value of MI can be systematically shifted by subjective evaluation of the initial period of prophase that is not very prominent and also late telophase that is hard to distinguish from early cytokinesis (Fig. 1b4). Therefore, comparisons should be done with samples evaluated by the same person. In a non-synchronized culture the MI reaches its peak of 10-12 % in exponential phase usually between the second and the fourth day of cultivation and usually fades out on day 5, as also described by Nagata *et al.* (1992).

Differences in mitotic activity can be tested in same way as viability, i.e. by proportion test. Orchard *et al.* (2005) used 3 x 200 cells sampling for demonstrating differences in proportions of each mitotic phase. Sample size for basic comparison of the mitotic activity of two samples can be also estimated using equation 1a. According to this, a sample covering

300 cells is sufficient to demonstrate the difference of 5 %, 600 cells per 3 % difference or 3000 cells per 1 % difference at the level of significance $\alpha = 0.05$.

Cell length

The length of BY-2 cells is a basic morphological parameter that often changes in response to experimental treatment, or as a result of modulated expression of certain gene in transgenic lines. The cell length is not constant, but gradually changes during the subculture interval due to simultaneous opposing processes - cell elongation and cell division. The difference in cell length can result from both varying cell proliferation dynamics and altered cell expansion. In the wild-type BY-2 line under standard cultivation conditions, the minimal cell length well correlates with the peak of mitotic activity (Fig. 2a). As both MI and cell length depend on the initial cell density (Fig. 2a), this parameter should be rigorously normalized. Alternatively, evaluation in the stationary phase can be recommended because of minimal cell length fluctuations in this period (see changes of measurement reliability in Fig. 3). Moreover, the overall variability of cell lengths in the stationary culture is slightly lower than in the exponential cells. Variation coefficient of cell length in the exponential phase is between 30 % and 55 % (mean 40 %), whereas it reaches 28 % to 40 % (mean 35 %) in the stationary culture. In stationary cells, the differences between variants reflect mostly changes in the cell expansion and are not affected by cell divisions that can otherwise mask or magnify the effect of an experimental treatments or a transgenic phenotype.

The average length of stationary cells reaches 69 - 80 μm under our cultivation conditions. The values of cell length do not exhibit normal symmetrical distribution, but the histogram is right-skewed (Fig. S1). This reflects the natural limit of BY-2 cells that are rarely shorter than a certain value (30 μm for stationary cells), while the upper limit of cell sizes can reach surprisingly high values, especially in the case of stationary cultures (up to 350 μm). The cell length data could be transformed into a normal distribution using the Box-Cox power transformation. However, given that the number of data sets from metric measurements is high (> 100 observations), the overall analysis can be performed using ANOVA, which is robust to non-normal distribution of data in such numerous data files (Milliken and Johnson 1984). Paired comparisons can be correctly performed by Tukey test (Hoaglin *et al.* 2011).

Effect of cell affiliation to cell files

Sizes of cells measured in captured pictures are not independent, but show dependence on the affiliation to individual cell files. The cell length heterogeneity is usually lower within each cell file compared to heterogeneity of the whole cell population (Fig. S2). The morphological similarity of cells within a file is likely related to their common ancestor and symplastic interconnections (Laporte *et al.* 2003), which were demonstrated to mediate mutual physiological synchronization of cells within a file (Campanoni *et al.* 2003, Maisch and Nick 2007).

Data sets of cell length can be analyzed by basic linear modeling of the mentioned tests. One of the assumptions of such model is independence of the measurements. However, the values of cell length are not fully independent. Hence, the most correct model for the data is a random effect model, with the cell-file affiliation as the random effect. Comparison of the two approaches (simple linear and random effect models) can be done via Akaike Information Criterion. It was found that the random effect models is for the data much better (e.g. AIC = 10116 for simple linear model and AIC = 9606 for random effect model).

However from practical point of view, the registration of cell file affiliations is problematic when cell files overlap, and increases the time required for sample preparation (see second column of Table 1) and image analysis (3rd column of Table 1). The upcoming question is, how large should be the sample of cells, so that we can obtain reasonable results, while neglecting the cell file affiliation. Since we will compare two independent samples, we will use the equation 1b rising from the two-sample t-test (Chow *et al.* 2003). This equation expects that we work with independent data. When the data are structured into cell-files, we can expect that the observed variability is lower than those in independent data. Hence, if we evaluate this equation with greater variability (term SD in the equation 1b), we will obtain the necessary sample size for our situation. The other parameters of the equation remain the same nevertheless the data are dependent or not. The remaining question is how much we should increase the variability. When comparing the two linear models, with and without the random effect of cell affiliation, we can check, how much changes the explained variability. The simple linear model explains 12 % of the variability, whereas the model with random effect for cell affiliation explains 77 %. Hence, the observed variability can be reduced up to by 65 % (77 % - 12 %) comparing to the situation if the data were independent. The right sample size can be obtained when using observed standard deviation multiplied by $100/35$ (= $100/(100-65)$) on place of SD.

Cell density measurement

The measurement of BY-2 cell density using conventional counting chambers (e.g. Burker's, Thoma's) is complicated by relatively large size of BY-2 cell files. Average thickness of BY-2 cell is around 30 μm , the length of stationary cells is about 80 μm (Kouri *et al.* 2003, Sorrel *et al.* 1999), that makes the cell file dimension reaching hundreds of micrometers or can exceed even one millimeter. Suspension of such "bodies" is prone to form dense clumps of cell files inside the counting grid or aside of it, both heavily affecting the accuracy of a single measurement. Irregular spread of measured particles can be expected especially when counting chambers with 100 μm depth are used. To assess the effect of chamber depth, we compared the results obtained by using four counting chamber types; Fuchs-Rosenthal's (200 μm depth), Burker's (100 μm), Neubauer's improved (100 μm) and Thoma's (100 μm). The differences between cell density estimated in these chambers were not significant ($\alpha = 0.05$) when counting 30 images containing approx. 12 000 – 22 000 cells in total, but the data sets greatly differed in variation (Fig. S3a) that was lowest in case of Fuchs-Rosenthal's chamber. Thus, in this chamber cell density can be estimated from smaller number of images. According to equation 1b we can estimate that approximately 6-times more images are required when using 100 μm -deep chambers to obtain cell density estimation in accuracy comparable to Fuchs-Rosenthal's chamber.

Fuchs-Rosenthal's chamber is deep enough to enable almost accurate movement of an applied sample of BY-2 cell suspension and it is also shallow enough to be acceptably focused with an objective with 4-fold or 10-fold magnification. Such a low magnification enables scanning of a large field of the counting chamber by microscope camera. We recommend collecting images of cells with fluorescent labeled nuclei (Hoechst 33342 or DAPI), which can be subsequently quantified by (semi)automatic image analysis software (Fig. 1c). Resolution of the images must be high enough to cover any nucleus with at least 5 pixels to enable the software to reliably detect nuclei in contrast to the background and also to separate close nuclei from each other. It is not necessary to quantify the cells according to the counting grid of the chamber. The counting chamber can be used just as an instrument providing proper Z dimension (depth) and XY dimensions of the analyzed volume are defined by screen area of the camera. Cell density can be calculated according to the total volume of screened area. The most appropriate data are obtained when the whole grid of the Fuchs-Rosenthal chamber is covered by 150 - 1500 cells. Application of more dense suspension into

the counting chamber leads to formation of clumps of cell files that increase variation / inaccuracy of single measurement. It can be seen from the comparison of the variation of properly dense (diluted) sample and 5-times denser (undiluted) sample (Fig. S3b). Therefore dense suspensions (usually since the 3rd day of SBI) should be diluted to the recommended value between 150 and 1500 cells within the counting grid.

Suspensions of isodiametric individual cells are usually applied in excess and the redundant liquid flows out to marginal drains of the chamber. This procedure cannot be adopted in the case of BY-2 cells because their movement within the counting chamber is irregular, highly affecting the numeric data obtained. The sample of BY-2 cells should optimally be applied as a single drop of appropriate size (approx. 3 mm in diameter, i.e. 15 to 20 μ l) using a wide-cut tip. The sample should not overflow the counting area of the chamber.

An alternative approach to overcome the obstacles discussed above is adoption of some maceration technique. These techniques are frequently used for separation of cells from a tissue (Johansen 1940, Brown & Rickless 1949). Maceration is generally based on modification of cell wall solidity and especially loosening of the middle lamella (Johansen 1940, Němec 1962). Acidic maceration (e.g. 15 % HCl + 15 % ethanol; Johansen 1940) or HCrO₄ treatment (5 % aqueous solution) described by Brown and Rickless (1949) can be applied on BY-2 cell suspension leading to softening and partial splitting of long cell files (Sorrel *et al.* 1999). We confirmed that maceration with HCrO₄ made even very dense BY-2 suspension suitable for reproducible pipetting. It resulted in decreased variation of data obtained from the counting chamber. However, in case of diluted samples, the maceration did not decrease variation compared to the results obtained with our optimized procedure described above (Fig. S3b). Moreover, maceration needed extra treatment of samples and in case of HCrO₄ handling with extremely toxic and carcinogenic compound (Dayan and Paine 2001). Other maceration techniques using less harmful agents (e.g. HCl + ethanol) require additional staining of cells (e. g. Orcein) for subsequent image analysis (HCrO₄ causes shrinkage of protoplasts into dark brown particles that can be easily counted).

Taking together these results, we recommend our optimized procedure based just on a counting chamber of 200 μ m depth (e. g. Fuchs-Rosenthal; Sorrel *et al.* 1999), proper dilution and pipetting of investigated samples stained by Hoechst or DAPI. Such procedure provided reliable data and was less time consuming compared to the maceration. Gentle processing of cells also enabled evaluation of morphological parameters and mitotic index from the same images.

Qualitative parameters of cell density data

The variation of obtained density data is very high. The coefficient of variation calculated for 194 available data files was within the range of 7 % - 50 %, the average value of this data parameter was 23 %. Based on this value, we can estimate the required size of data set (number of scanned fields) for the statistical comparison (e.g. t-test) of two samples. Modified equation 1c can be used for such estimation. The size of data set for the significant detection of 10 % difference in density between two samples was calculated to be 177. It is practically impossible to investigate cell density by such extensive sampling. However, when such number of scanned fields is used to cover the whole subculture interval, we can obtain highly representative growth curve describing the growth features of investigated lines. Such an approach is described and discussed below in the section A2.

The time required for evaluation of basic growth and physiological parameters of one sample is summarized in Table 1.

Parameter	Sample processing	Subsequent analysis	Postponed processing	Special comment
viability	5 – 10 min	5 – 15 min	yes – from saved image data	Simple. Exact and well reproducible results.
mitotic index	5 – 10 min	5 – 15 min	yes – from image	Simple. Exact and well reproducible results.
cell length	5 – 10 min	20 – 40 min	yes – from image	Exact and highly reproducible results. Moderately laborious.
cell width	5 – 10 min	20 – 40 min	yes – from image	Exact and highly reproducible results. Moderately laborious
density	10 – 15 min	30 – 60 min	yes – from image	Cell files are too large to behave normally in the counting chamber. Application of a small culture volume reduce variability, good scanning equipment and software for image analysis helps to accelerate density evaluation.
fresh weight	< 5 min	< 5 min	no	Non-reproducible separation of intact cells from the medium. We recommend estimating FW as density multiplied with average cell volume.
dried weight	< 5 min (+ hours of waiting)	< 5 min	yes – from frozen samples	Simple. Exact and well reproducible results.

Table 1. List of growth and physiological parameters of BY-2 lines and time required for evaluation of a sample.

A2: Calculation of derived parameters

Growth curve calculation – data fitting

Due to the high internal variability of the primary density data the representative growth curve can be obtained either from high numbers of scanned fields (see above) or by fitting the primary data (e.g. by the method of least squares) to a modified logistic curve according to equation 2. Keeping an acceptable degree of inaccuracy, this approach enables to reduce the number of required primary data and to smooth the curve. The main features such as the slope and duration of the exponential phase are maintained by this approach (Fig. 2b).

The fitting of data to the logistic curve has several critical points, which are described in detail. The first of them is “rooting”, i.e. fitting the curve to the initial point. Since the lag-phase is usually very short in BY-2 cells, the lower asymptote of the curve has too low amount of numeric data to be fitted properly (the density values are missing before the starting point). Therefore we suggest to calculate the confidence interval ($\alpha=0.05$) for the density value at time 0 and to set this interval as a restriction for the initial value of the calculated curve. The confidence interval can be easily calculated from primary density data using equation 3.

Data presented in Fig. 2 show the growth characteristics of WT BY-2 cells in one-day sampling. The pattern of sampling can be adjusted. Periods of special interest (e.g. lag-phase) can be sampled more frequently (e.g. every 8 or 12 hours). On the other hand, some days can be omitted from the sampling schema to optimize the use of human resources. An analysis of importance of each sampling day within the 7-day SBI was performed on our dataset. It showed that the values of day 1 and 2 are of low importance if the curve is “rooted” into the confidence interval of the day 0. However, we do not recommend omitting the measurement on day 1 because this value can indicate altered dynamics of the initial growth, if affected (not documented in our illustrative dataset). Day 2 can be skipped when the initial period of growth is not a subject of interest. Also day 6 is of low importance for data fitting. In contrast to this, it is very important to correctly measure the day when the culture abandons exponential growth and slows its metabolic activity, usually the 4th or 5th day (Fig. 2b). Omitting the value from this “turning point” cause the most significant distortion of the fitted curve shape (Fig. 4).

Cell cycle and mitosis duration

The period of constant exponential growth is apparent as a linear part of growth curves when cell density is displayed in logarithmic scale. Provided that practically all cells undergo cell divisions within this period, the doubling time of the cell density should equate to the duration of cell cycle (see equation 4; Richard *et al.* 2001). The calculated values between 18.6 and 20.2 hours well correlate with the values documented in literature (Nagata *et al.* 1992). Cell cycle duration is obviously a basic parameter that can be changed under various experimental treatments or by genetic modifications.

The duration of the mitotic phase of the cell cycle can be estimated from the proportion of cells in mitosis (= MI) during this period of exponential growth (i.e. cell cycle duration * MI; equation 5). The calculated value of about 2 hours is again in agreement with literature (Granger and Cyr 2000).

Biomass and the rate of cell file elongation

Measurement of fresh weight of BY-2 culture is complicated due to the inefficient and non-reproducible separation of the cultivation medium from intact cells using either sedimentation or filtration procedures (using either vacuum or capillarity-based filtration). The fresh biomass can be estimated indirectly by using the biometric and cell density data, as cumulative cell volume i.e. the average cell size multiplied with cell number (density; equation 6). The curve of calculated biomass (Fig. 2c) clearly shows rapid increase, which is also visually apparent between the 4th and 5th day and is caused by synergic effect of high mitotic activity and highest rate of cell elongation in this period.

B: Guidelines for designing commonsensible experiments

Image data storage and subsequent analysis

Direct evaluation of growth parameters during the experiment limits the number of samples that can be processed and brings high demands on work performance, since the quality of the samples changes over time. Therefore it is highly advisable to separate the sample processing, scanning and storing images from subsequent evaluation and numerical data processing. This approach allows reliable capturing of the rapidly changing parameters such as viability or mitotic index and inclusion of a larger number of parallel samples or replicates.

Capturing of universally applicable images can also reduce the time required for sample analysis. In this respect density, mitotic index and cell sizes can be evaluated from the same fluorescent-labeled image captured in the Fuchs-Rosenthal counting chamber (for density assessment). For MI determination, images must have sufficient resolution to allow evaluation of the mitotic activity, at least $1 \text{ px} = 1 \mu\text{m}$.

Images of FDA labeled cells for viability assessment must be captured separately, but their number need not be high, because approx. 300 cells is sufficient to demonstrate 5 % decrease in viability at $\alpha = 0.05$ (see chapter A1).

Estimation of the minimal sample size

Appropriate calculation of numeric sample size is essential step in building of experimental design. It is advisable to state/estimate in advance the minimal difference between the variants that we would like to demonstrate. This statement or estimation is researcher's choice: "How large difference is relevant for testing of my scientific hypothesis? Am I going to demonstrate the difference of 15% or 0,01% in cell length?". Processing of too large sample size may lead to highly significant approval of negligible differences, that are as tiny as they are practically/biologically irrelevant (Fay and Gerow 2013). On the other hand, the data sets have to be large enough to identify and demonstrate a certain difference between the compared samples. Underestimation of sample size may lead to weak or completely unsuccessful statistic approval of experimental results. However, appropriate reduction of the number of analyzed cells saves time and thus allows analysis of a larger number of experimental variants, that is highly advisable.

The required sample size can be thereafter predicted by equations 1a,b,c. For transgenic/treated variants, whose morphological variability is not dramatically different from the control, the estimation can be done on the basis of the chart in Fig. 5, which is based on Equation 1b (Chow *et al.* 2003).

Initial cell density – dilution of the culture

Nagata described the ability of the BY-2 line to increase its biomass 100-times during one-week subculture interval and therefore recommended the week subculture with 100-fold dilution. According to Nagata, the growth of BY-2 line below this multiplication ratio is suboptimal and the culture conditions need to be optimized (Nagata 2004, Nagata and Kumagai 1999). In most laboratories, however, the BY-2 lines grow in lower volumes and using a different mode of aeration; shaking instead of rolling used in Nagata's work. Under such conditions, the cultures are diluted only 20x to 30x per a week (Koukalova *et al.* 1997, Schwarzerova *et al.* 2003, Seifertova *et al.* 2014). As clearly visible from Fig. 2b, lower dilutions result in a shorter lag phase, but longer time of “stagnation” in the stationary, physiologically less active state. Maximally diluted suspensions show practically constant multiplication rate for 4 days, while this period decreases in less diluted suspension (see the duration of the phase of exponential multiplication, i.e. the linear part of the curve in Fig. 2b). Nagata and others stated that decreased growth activity of the lines causes amongst others significant decrease of efficiency in cell cycle synchronization (Nagata and Kumagai 1999, Samuels *et al.* 1998). Our results also show that increased dilution (up to 60x) has a positive effect on morphological uniformity of cells (see error bars in the Fig. 2a). Consequently the overall reproducibility of the results of morphological analysis can be significantly improved. Moreover, Kovarik *et al.* (2012) demonstrated dramatic alterations of karyotype (variation between 39-47 chromosomes) in BY-2 cell line grown long time under low dilution rate (the culture was diluted 10x by week subculture). As the nuclear DNA content changes can affect the morphological uniformity of cells, we performed cursory flow-cytometry analysis in our BY-2 cells compared to leaf cells of *Nicotiana tabacum* cv. ‘Samsun’. Although this approach did not allow precise karyotype assessment, the results did not indicate dramatic karyotype alterations and any ploidy shift in our cultures standardly diluted 50x by week subculture (Fig. S4).

Analysis of phenotypic variability of transgenic lines

The BY-2 line is a valuable tool for functional genomics, especially in cases when the phenotypic change resulting from modulated expression of a certain gene is masked by compensatory mechanisms *in planta* (Dvorakova *et al.* 2012). Differences between the phenotype of transgenic and wild type lines have to be demonstrated carefully due to natural variability of both wild type and transgenic BY-2 cell lines that can either reduce or escalate the real phenotypic change in suboptimal experimental design. This variability has several sources.

The first source of variation arises from the cultivation of transgenic BY-2 in the form of *calli* resulting from the transformation procedure. We observed that BY-2 cell lines transferred from suspension to solid media and reverted again several weeks later to suspension can be slightly altered in morphologic features (Fig. 6). Although these shifts are minor, they can be statistically significant, when the data matrix is large.

The second cause of variation is related to the transformation event itself. The T-DNA can be inserted into various chromosomal locations, where it can interfere with flanking DNA resulting in varying expression patterns (Nocarova and Fischer 2009). The stress conditions connected with the transformation procedure and subsequent antibiotic selection can also affect the phenotype of the cells.

To avoid misinterpretations we suggest including of two types of control in the experiment. The first, a few (e.g. three) suspensions obtained by independent resuspension of wild type BY-2 calli, which were at least two months (≈ 3 subcultures) grown in a *callus* form. The second control should cover several (> 3) lines transformed with an empty vector (or a gene construct with known absence of phenotypic effect, e.g. gene encoding free cytosolic GFP; Seth and Viersta 1998; Stewart 2001). All suspensions should be established from *calli* of comparable size, rigidity and age (1 to 2 weeks after subculture).

The set of investigated transgenic lines should be relatively numerous (e.g. at least 5 to 10 lines) due to high variability within the primary transgenic population. As mentioned above, the T-DNA can be inserted in different chromosomal contexts, in various numbers of insertions and transgene expression can be epigenetically modified in the lines (Nocarova and Fischer 2009) or even expression of internal genes can differ between the lines as a result of feed-back regulation (Dvorakova *et al.* 2012).

Subsequent statistical analysis of transgenic phenotype can be tested using General Linear Model of ANOVA (GLM ANOVA). Each cell line tested within certain genotype class should be implemented into the statistical model as a „random factor“.

Calli as an alternative model for phenotype characterization

Alteration in cell size or proliferation rate of the investigated (transgenic) lines can be documented in the alteration of the biomass curve. Quantification of these parameters provides exact data, but is relatively laborious. Bigger alterations in growth of biomass can be also observed under cultivation of BY-2 cells in the form of *calli*. In case of transgenic lines, such phenotypic change can be seen already on the selection medium a few weeks after transformation. We repeatedly observed larger *calli* after transformation of BY-2 cells with constructs, which caused enhanced cell elongation (Dvorakova *et al.* 2012). However, differences in growth of *calli* can be masked or extended by the effect of *callus* density on a plate; growth of *calli* is inhibited when their density is too low or too high! This can be overcome by the cloning of transgenic suspension cells and plating them in various densities (Nocarova and Fischer 2009). Altered growth/cell size could be demonstrated as a difference in *callus* diameter as shown in Dvorakova *et al.* (2012). Pairwise comparison of cell size and callus diameter (after cloning) of five selected BY-2 cell lines provided highly comparable statistical output (Fig. S5). Also correlation between cell length and callus size was proven by testing of linear regression model at $\alpha=0,05$ ($p=0,013$).

Equations:

Equation 1a (MI / VIA req. sample size): $n_i = ((Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2 / \Delta p^2) * (2p_0 + \Delta p - p_0^2 - (p_0 + \Delta p)^2)$

Equation 1b (required sample size): $n_i = 2 * (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2 / ((\mu_1 - \mu_2) / SD)^2 + Z_{1-\alpha}^2 / 4$

Equation 1c (cell density req. sample size.): $n_i = 2 * (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2 / ((\mu_1 - \mu_2) * 0,23)^2 + Z_{1-\alpha}^2 / 4$

Equation 2 (logistic curve): $Y(t) = A + (K - A) / (1 + Q * (2,718^{-2*(t-M)})^{1/v})$

Equation 3 (confidence interval): $CI = Z_{1-\alpha} * SD / (\sqrt{n})^2$

Equation 4 (cell cycle duration [h]): $t = (t_2 - t_1) / \log_2(\text{density}_{t_2} / \text{density}_{t_1})$

Equation 5 (mitosis duration[h]): $t = t_{(\text{cell cycle duration})} * MI$

Equation 6 (biomass volume [ml/ml]): $V = D * \pi * L * W^2 / (4 * 10^{12})$

Equation legend:

A = lower asymptote (initial density level)

D = measured cell density [cells/ml]

K = upper asymptote (terminal density level)

L = measured cell length [μm]

W = measured cell width [μm]

Q, M, v = logistic curve parameters to be computed to fit the curve to the experimental data

t_1, t_2 = days of measurement

p_0 = proportion of events in control sample (e.g. viability / mitosis of control sample)

Δp = proportion difference to be tested

$Z_{1-\alpha}$: 1- α quantile of normal distribution (α = significance level). Theoretical value that can be obtained e.g. by MS Excel: $Z_{1-\alpha} = \text{NORMINV}(1-\alpha;0;1)$

$Z_{1-\beta}$: $1-\beta$ quantile of normal distribution ($1-\beta = \text{power of the test}$). Theoretical value that can be obtained e.g. by MS Excel: $Z_{1-\beta} = \text{NORMINV}(1-\beta;0;1)$

SD: expected variability (standard deviation). The value for stationary cell length of unaffected wild type BY-2 is approx. $35 \mu\text{m}$. The variability can be estimated by preliminary measurement.

$\mu_1 - \mu_2$: difference to be demonstrated between means of the measured values of the compared variants

Acknowledgement

Funding was provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (NPUI L01417). We thank to Dr. Tomas Urfus for flow-cytometry analysis of BY-2 cells. We also thank to Dr. Maria Barker-Mott for linguistic revision of the manuscript.

References

- 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.
- Chow S.C., Shao J., Wang H.: Sample size calculation in clinical research. - Marcel Dekker, Inc.: 466 pp., 2003.
- David K.M., Perrot-Rechenmann C.: Characterization of a tobacco Bright Yellow 2 cell line expressing the tetracycline repressor at a high level for strict regulation of transgene expression - Plant Physiology, **125(4)**: 1548-1553, 2001.
- Dayan A.D., Paine A.J.: Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. - Human & Experimental Toxicology, **20(9)**: 439-451, 2001.
- Dvorakova L., Srba M., Opatrny Z., Fischer L.: Hybrid proline-rich proteins: novel players in plant cell elongation? - Annals of Botany **109(2)**: 453-462, 2012.
- Fay D.S., Gerow K.: A biologist's guide to statistical thinking and analysis, - WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.159.1, <http://www.wormbook.org> , 2013.
- Granger C.L., Cyr R.J.: Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. - Planta **210(3)**: 502-509, 2000.
- Hoaglin D.C., Mosteller F., Tukey F.W.: Exploring Data Tables, Trends, and Shapes. - John Wiley & Sons. 560 pp., 2011.
- Hoffmannova J., Schwarzerova K., Havelkova L., Borikova P., Petrasek J., Opatrny Z.: A novel, cellulose synthesis inhibitory action of ancymidol impairs plant cell expansion. - Journal of Experimental Botany **59**: 3963-3974, 2008.
- Johansen D.A.: Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York. 523 pp., 1940.
- Koukalova B., Kovarik A., Fajkus J., Siroky J.: Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. - FEBS letters **414(2)**: 289-292, 1997.
- Kouri T., Gyory A., Rowan R.M.: ISLH Recommended Reference Procedure for the Enumeration of Particles in Urine. - Laboratory Hematology **9**: 58-63, 2003.

Kovarik A., Lim K. Y., Souckova-Skalicka K., Matyasek R., Leitch A. R.: A plant culture (BY-2) widely used in molecular and cell studies is genetically unstable and highly heterogeneous. - *Botanical Journal of the Linnean Society*, **170(3)**: 459-471, 2012.

Krtkova J., Havelkova L., Krepelova A., Fiser R., Vosolsobe S., Novotna Z., Martinec J., Schwarzerová K.: Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. - *Plant Physiology and Biochemistry* **60**: 88-97, 2012.

Kumagai-Sano F., Hayashi T., Sano T., Hasezawa S.: Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. - *Nature protocols*, **1(6)**: 2621-2627, 2007.

Kutík J., Kuthanová A., Smertenko A., Fischer L., Opatrný Z.: Cadmium-induced cell death in BY-2 cell culture starts with vacuolization of cytoplasm and terminates with necrosis. - *Physiologia plantarum*, **151(4)**: 423-433, 2014.

Kuthanova A., Fischer L., Nick P., Opatrny Z.: Cell cycle phase specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. - *Plant Cell and Environment* **31(11)**: 1634-1643, 2008.

Kutsuma N., Hasezawa S.: Dynamic Organization of Vacuolar and Microtubule Structures during Cell Cycle Progression in Synchronized Tobacco BY-2 Cells - *Plant Cell Physiology* **43(9)**: 965-973, 2002.

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.

Maisch J., Fiserova J., Fischer L., Nick P.: Tobacco Arp 3 is localized to actin-nucleating sites *in vivo*. - *Journal of Experimental Botany* **60**: 603-614, 2009.

Matsuoka K., Demura T., Galis I., Horiguchi T., Sasaki M., Tashiro G., Fukuda H.: A Comprehensive Gene Expression Analysis Toward the Understanding of Growth and Differentiation of Tobacco BY-2 Cells. - *Plant Cell Physiology* **45(9)**: 1280-1289, 2004.

Milliken G.A., Johnson D.E.: Analysis of messy data. - Volume 1 Designed experiments. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 473pp., 1984.

Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco Tissue cultures. - *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497, 1962.

- 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.
- Nagata T.: When I encountered tobacco BY-2 cells! – In: Nagata T., Hasezawa S., Inzé D. (ed.) *Tobacco BY-2 Cells. Biotechnology in Agriculture and Forestry Volume 53*: Pp. 1-5, Springer Berlin Heidelberg 2004.
- Nagata T., Matsuoka K., Inzé D. (ed.): *Tobacco BY-2 Cells: From cellular dynamics to omics Biotechnology - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Agriculture and Forestry Volume 58*: 107-115, 2006.
- Němec B.: *Botanická mikrotechnika*. - Nakladatelství československé akademie věd. Praha. 485 pp., 1962.
- Nocarova E., Fischer L.: Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. - *BMC Plant Biology* **9**: 44-55, 2009.
- Opatrný Z., Opatrná J.: The specificity of the effect of 2,4-D and NAA on the growth, micromorphology, and occurrence of starch in long-term *Nicotiana tabacum* L. cell strains. - *Biologia plantarum* **18**: 359-365, 1976.
- Opatrný Z., Nick P., Petrasek 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
- Orchard C.B., Siciliano I., Sorrell D.A., Marchbank A., Rogers H.J., Francis D., Herbert R.J., Suchomelova P., Lipavská H., Azmi A., Onckelen H.V.: Tobacco BY-2 cells expressing fission yeast cdc25 bypass a G2/M block on the cell cycle. - *The Plant Journal* **44(2)**: 290-299, 2005.
- Pieruschka R., Poorter H.: Phenotyping plants: genes, phenes and machines. - *Functional Plant Biology*, **39(11)**: 813-820, 2012.
- 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.
- Samuels A., Meehl J., Lipe M., Staehelin L.A.: Optimizing conditions for tobacco BY-2 cell cycle synchronization. - *Protoplasma* **202**: 232-236, 1998.
- Sato F.: Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications. - *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77(1)**: 1-9, 2013.

Schaul O., Mironov V., Burssens S., Van Montagu M., Inze D.: Two Arabidopsis cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. - Proceedings of the National Acadademy Sciences USA **93**: 4868-4872, 1996.

Schwarzerova K., Pokorna J., Petrasek J., Zelenkova S., Capkova V., Janotova I., Opatrny Z.: The structure of cortical cytoplasm in cold-treated tobacco cells: the role of the cytoskeleton and the endomembrane system. - Cell Biology International **27(3)**: 263-265, 2003.

Seifertova D., Klima P., Parezova M., Petrasek J., Zazimalova E., Opatrny 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 Moleculer Biology **36**: 521-528, 1998.

Sorrell D.A., Combettes B., Chaubet-Gigot N., Gigot C., Murray J.A.H.: Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cells. - Plant Physiology **119**: 343-351, 1999.

Sorrell D.A., Menges M., Healy J.S., Deveaux Y., Amano C., Su Y., Nakagami H., Shinmyo A., Doonan A.H., Sekine M., Murray J.A.: Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. Plant Physiology **126(3)**: 1214-1223, 2001.

Stewart C.N.: The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. - Plant Cell Reports **20**: 376-382, 2001.

Wang H., Chow S.C.: Sample Size Calculation for Comparing Proportions. - Wiley Encyclopedia of Clinical Trials. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA, 2007.

Widholm J.M.: The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. - Biotechnic & Histochemistry **47(4)**: 189-194, 1972.

Figures

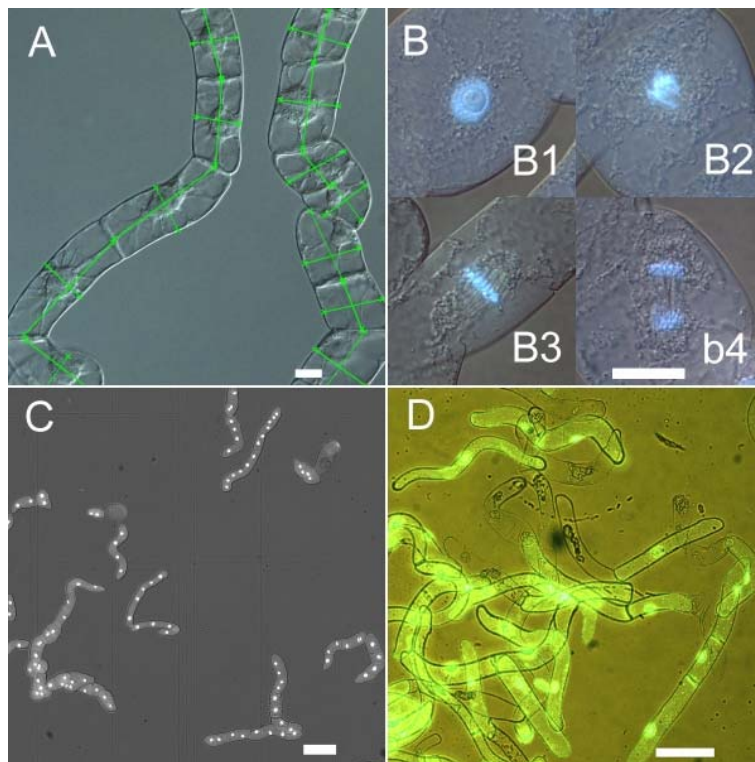


Fig. 1: Illustrative pictures showing evaluation of main phenotype features. (A) Cell length and width; (B) mitotic index evaluation; (B1) interphase nuclei; (B2) prophase; (B3) metaphase; (B4) anaphase/telophase; (C) cell density determination (Hoechst staining); (D) viability (FDA staining). Scale bar = 10 μm in (A) and (B); 100 μm in (C) and (D).

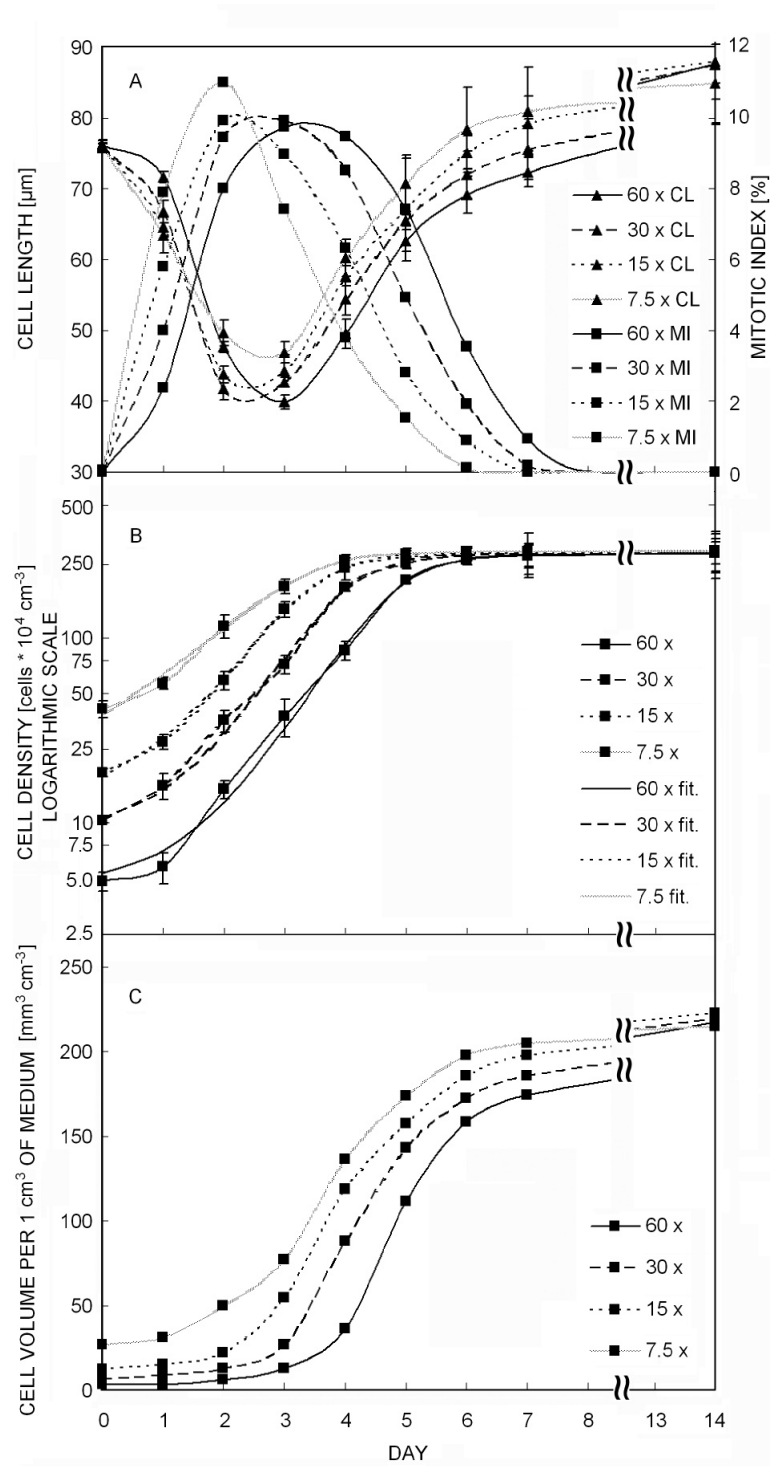


Fig. 2: Changes in selected parameters during a week subculture interval on wild-type BY-2 lines differing in initial cell density. A) Mitotic index and cell length. B) Cell density. C) Calculated biomass (estimated from cell size and cell density).

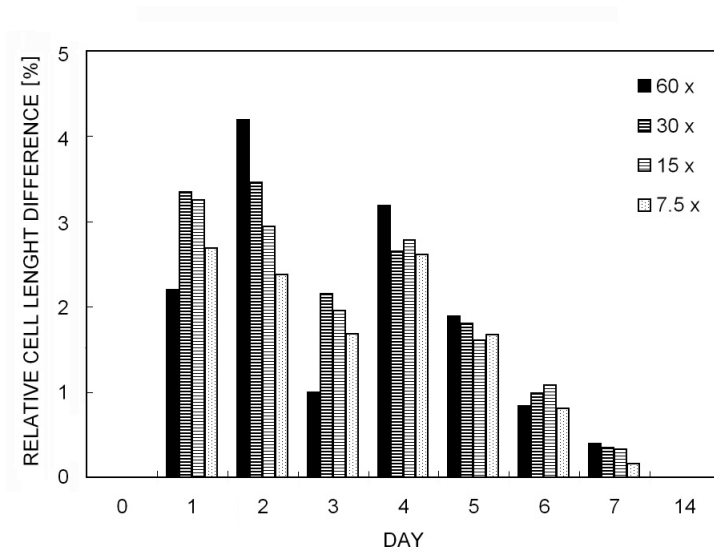


Fig. 3: Reliability of cell length measurement during a week subculture interval in wild-type BY-2 lines differing in initial cell density. The columns indicate average differences (calculated from absolute values) between the cell length in the respective time and cell length 6 hours before and after.

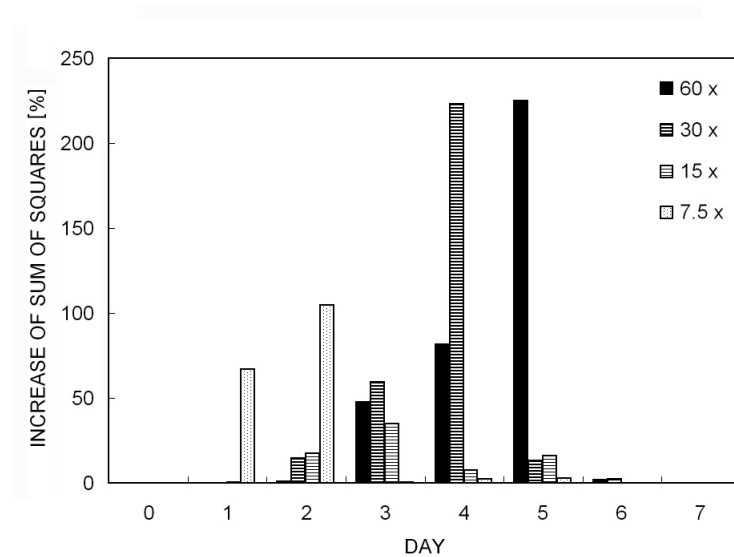


Fig. 4: Relative importance of density measurement in each day of SBI in wild-type BY-2 cultures differing in initial cell density. The columns indicate increases in the sum of squares of differences (on every day) between the curve obtained from all data (see Fig. 2B) and the curve constructed with omission of the particular day.

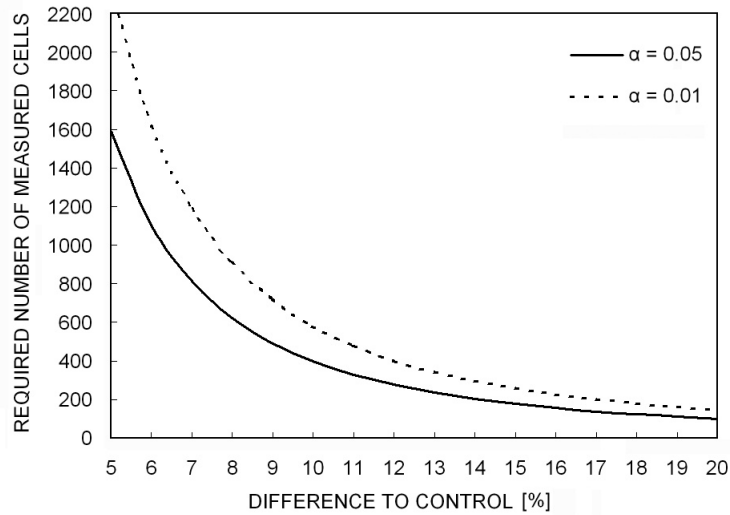


Fig. 5: Estimation of the minimal sample size based on Equation 1b. X-axis indicates length difference between control and evaluated variant (in %) to be demonstrated. Y-axis indicates the minimal number of cells needed for evaluation. Solid line is applicable for $\alpha=0.05$, dotted line is applicable for $\alpha=0.01$

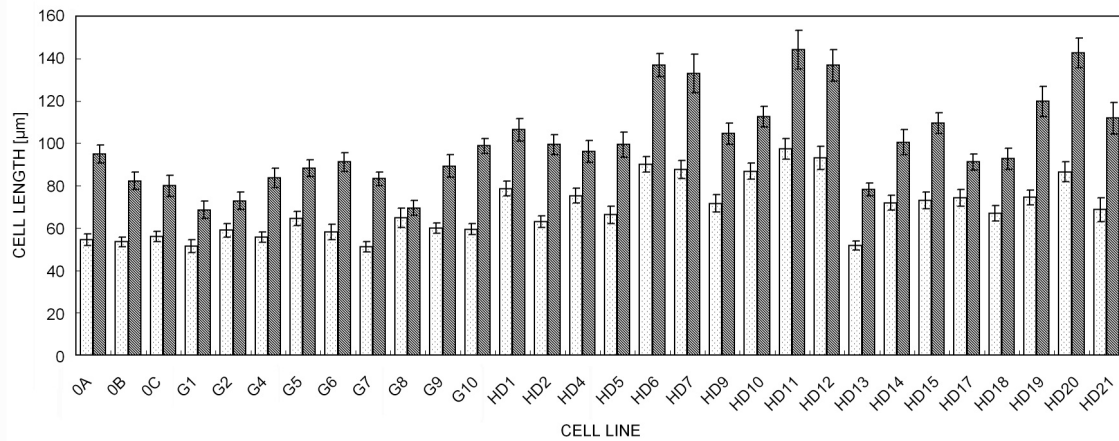


Fig. 6: Variability of cell length in wild-type and transgenic BY-2 lines. Graph presents three independent suspensions of untransformed BY-2 obtained by dispersion of independent *calli* (0A – 0C), nine lines overexpressing GFP (G1 – G10) and 18 lines overexpressing modified cell wall protein NtHyPRP1 (H1-H21; Dvorakova *et al.* 2012). Columns indicate cell length in the 3rd and 7th day (light gray and dark gray, respectively).

Supplementary data:

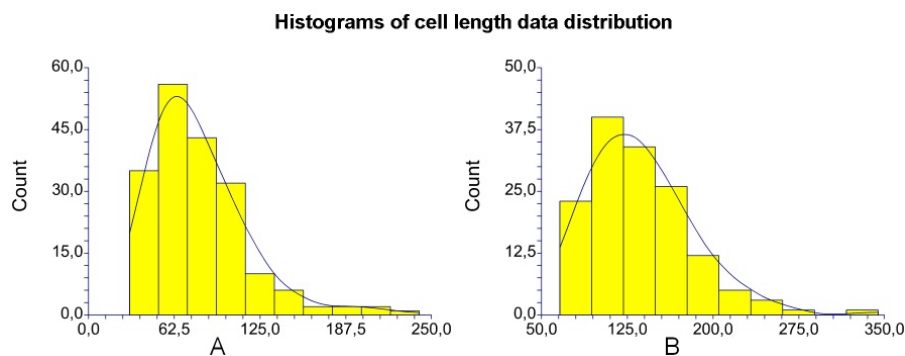


Fig. S1 (supplementary): Cell length data distribution. (A) Control BY-2 stationary cells; (B) Transgenic BY-2 cells with increased elongation resulting from overexpression of *NtHyPRP1* (Dvořáková *et al.* 2012).

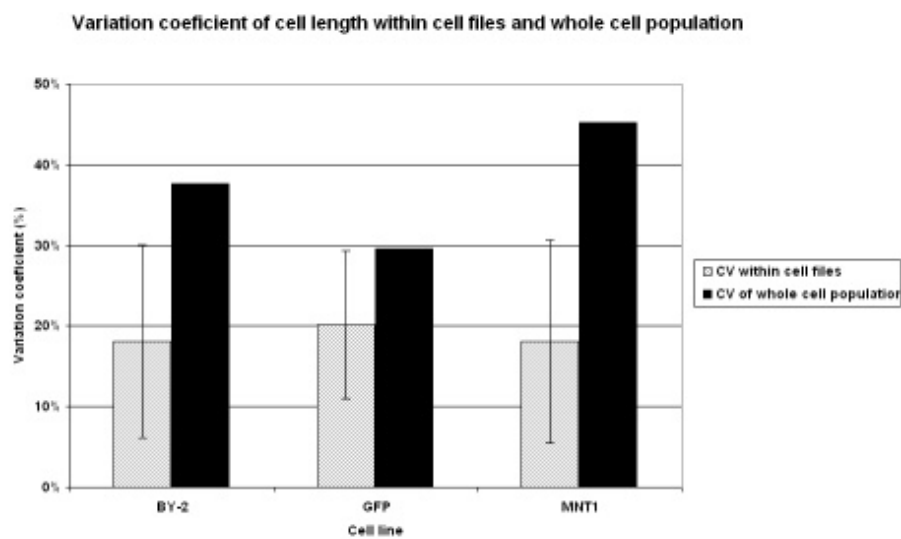


Fig. S2 (supplementary): Variation of cell length within the whole cell population (solid black columns) and average variation of cells within individual cell files. The values are demonstrated for wild type BY-2, a cell line overexpressing *GFP* and modified *NtHyPRP1* according to Dvorakova *et al.* (2012).

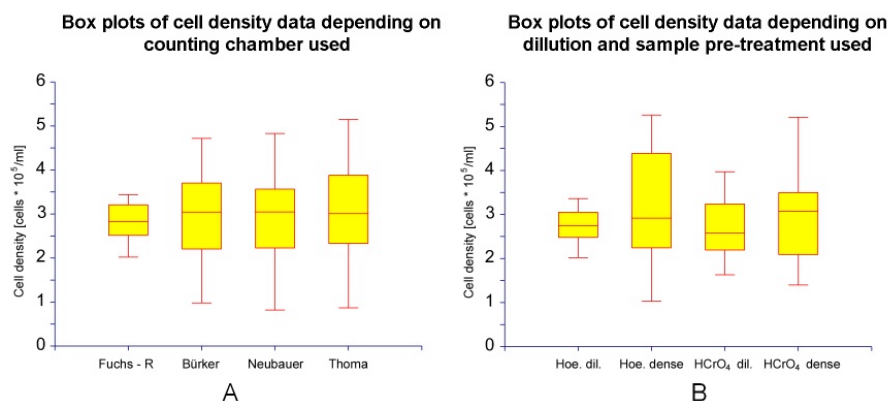


Fig. S3 (supplementary): Cell density measurement. (A) Box plots of density data obtained from four types of counting chambers: Fuchs – Rosenthal (recommended), Bürker, Neubauer and Thoma. (B) Box plots of density data obtained using Fuchs - Rosenthal chamber using four different types of cell suspension treatment: Hoechst staining of diluted culture as recommended, Hoechst staining of undiluted (5 times denser) sample, HCrO₄ treatment of diluted cells, HCrO₄ treatment of undiluted (5 times denser) sample.

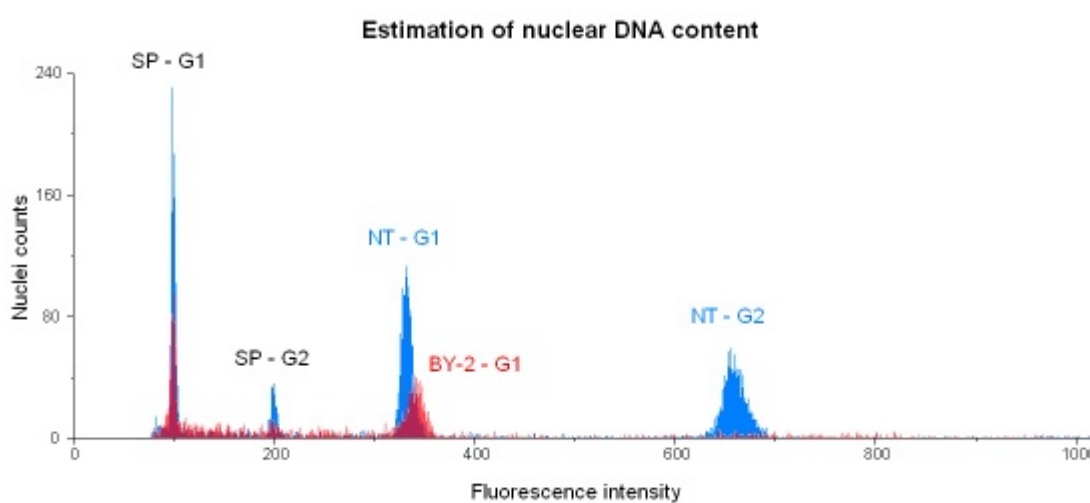


Fig. S4 (supplementary): Estimation of nuclear DNA content. Flow-cytometry comparison of DNA content in tobacco BY-2 cells (BY-2) and tobacco leaf cells *Nicotiana tabacum* cv. ‘Samsun’ (NT). Standardized to nuclei of *Solanum pseudocapsicum* (SP). G1, G2 – respective phases of cell cycle.

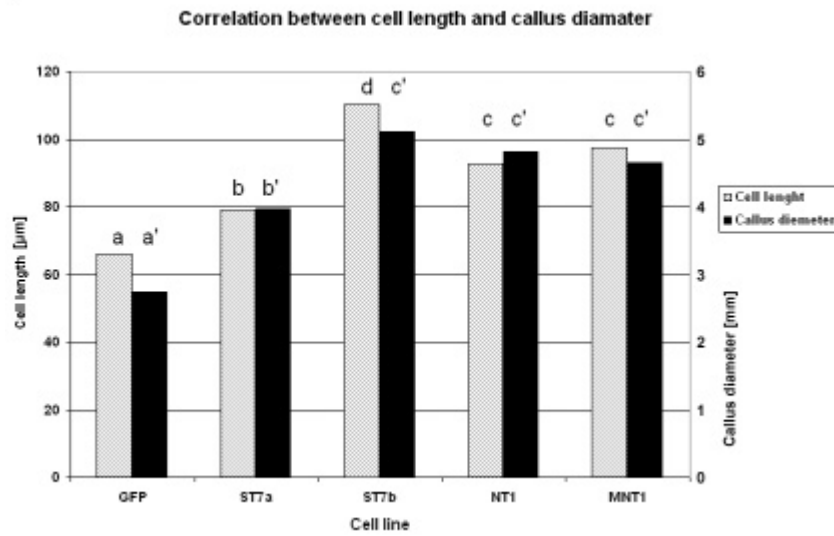


Fig. S5 (supplementary): Correlation between cell length and callus diameter. Dotted columns indicate average cell length (left Y-axis). Solid black columns indicate average diameter of *calli* of each cell line (right Y-axis). Letters above the columns indicate statistical significance of observed differences among cell lines. Cell line overexpressing GFP and four lines expressing genes encoding cell-wall proteins ST7 (two lines), NtHyPRP and modified NtHyPRP1 according to Dvorakova *et al.* (2012).