

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Luka Bačić

Dinamika kinetohora i kinezina-8 (Kif18A) u metafazi mitoze
Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biofiziku stanice na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ive Tolić (Zavod za molekularnu biologiju, Laboratorij za biofiziku stanice, Institut Ruđer Bošković, 10000 Zagreb, Hrvatska) i pod suvoditeljstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović (Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 10000 Zagreb, Hrvatska). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivi Tolić na pruženoj prilici, povjerenju i odvojenom vremenu za sve upite i pomoć pri izradi diplomskog rada. Biti dio vaše grupe bila je iznimna čast za mene.

Zahvaljujem od srca svim članovima grupe profesorice Tolić. Hvala Ivani na razumjevanju i na pomoći oko Illustratora, hvala Sonji što je uvijek bila pristupačna za upite, hvala Jurju i Jeleni na diskusiji, hvala Kruni i Renati na pomoći u eksperimentalnom radu, hvala Lejli na pomoći, hvala Mihaeli na pomoći pri analizi snimaka, hvala Barbari, Patriku i Ani na prijateljskoj podršci. Zahvaljujem se još jednom svima na prijateljskom pristupu, odličnoj atmosferi u labosu i korisnim savjetima. Iznimna mi je bila čast učiti i usavršavati se uz vašu pomoć.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Nenadu Pavinu i svim članovima biofizičke grupe profesora Pavina na konstruktivnim kritikama i prijedlozima prilikom izlaganja rezultata na grupnim seminarima.

Zahvaljujem se svim mojim prijateljima koji su uvijek bili tu za mene. Zahvaljujem se i svim profesorima koji su prenosili znanje na mene.

Na kraju, neizmjernu zahvalnost dugujem mojim roditeljima i sestri na njihovoj bezuvjetnoj podršci i bezgraničnoj ljubavi. Hvala vam što ste uvijek bili tu za mene, što ste brinili o meni, savjetovali me, pratili me kroz obrazovanje i što ste mi omogućili sve te životne prilike. Neizmjerne ste zvijezde vodilje na mom životnom putu.

Hvala vam

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Dinamika kinetohora i kinezina-8 (Kif18A) u metafazi mitoze

Luka Bačić

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb

Mitoza ili dioba stanične jezgre proces je podjele udvostručenih kromosoma stanicama-kćerima. U metafazi sestrinske kinetohore se dinamički kreću prema ekvatorijalnoj ravnini sve do početka anafaze. Kretanje kinetohora tijekom mitoze ovisi o dinamici mikrotubula. Značajan broj motornih proteina regulira dinamiku mikrotubula, a jedan od proteina je kinezin-8. Dosadašnji rezultati istraživanja pokazuju kako se kinezin-8 kreće prema plus kraju mikrotubula i potiče skraćivanje mikrotubula kod različitih organizama. Međutim, uloga kinezina-8 u promjeni smjera kretanja kinetohora nije poznata. Ovaj diplomski rad bavi se dinamikom kinetohora i kinezina-8 tijekom metafaze u ljudskoj staničnoj liniji U2OS. Konfokalnim pretražnim mikroskopom snimane su stanice U2OS sa stabilnom ekspresijom proteina CENP-A-GFP i mCherry- α -tubulin, te divlji tip tranficiranih stanica U2OS sa prolaznom ekspresijom Kif18A-EGFP i dodanom fluorogeničnom bojom SiR-tubulin. Analizirane su pozicije sestrinskih kinetohora i intenziteta signala kinezina-8 u diobenom vretenu tijekom metafaze. Rezultati su pokazali kako je stupanj oscilacija veći u intervalu vremenski daljem od anafaze u odnosu na interval 2 minute prije anafaze. Vanjske sestrinske kinetohore manje osciliraju u odnosu na unutarnje kinetohore. Zabilježena je pojava kuta β između pravca koji prolazi kroz kinetohore i okomice na ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena većeg od 30° u blizini središta diobenog vretena. Zabilježena je negativna korelacija između međukinetohorne udaljenosti i kuta β . Dobiveni rezultati intenziteta pokazuju kako prolazna ekspresija kinezina-8 smanjuje stupanj oscilacija sestrinskih kinetohora u metafazi mitoze.

(60 stranica, 32 slike, 2 tablice, 64 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: dinamika, metafaza, kinezin-8 (Kif18A), oscilacije, stanice U2OS

Voditelj: Prof. dr. sc. Iva Tolić, znanstvena savjetnica

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, red. prof.

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, red. prof.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Zamjena: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Rad prihvaćen: 10. 5. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of science
Division of Biology

Graduation Thesis

The dynamics of kinetochores and kinesin-8 (Kif18A) motor proteins in metaphase of mitosis

Luka Bačić

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb

Mitosis or nuclear cell division is the process which segregates duplicated chromosomes to two daughter cells. During metaphase, sister kinetochores oscillate around the equatorial plate of the mitotic spindle until anaphase onset. Movements of sister kinetochores depend on the microtubule dynamics. A large number of proteins regulate microtubule dynamics, and one of them is kinesin-8. It is known that kinesin-8s move toward plus-end of microtubule and stimulate microtubule shrinkage. However, the mechanism by which kinesin-8 regulates kinetochore directional switch during oscillations is not well understood. This graduation thesis is focused on quantitative characterization of the dynamics of kinetochores and kinesin-8 (Kif18A) motor proteins in metaphase of the human U2OS cell line. Confocal microscope was used for live imaging of U2OS cell line with stable expression of CENP-A-GFP and mCherry- α -tubulin, and wild type U2OS cell line transiently expressing Kif18A-EGFP with addition of fluorogenic probe SiR-tubulin. I analyzed the position of kinetochores in the mitotic spindle and signal intensity of kinesin-8 during metaphase of mitosis. The results show that kinetochore oscillation rate is greater in interval further from anaphase onset and inner kinetochores oscillate less than outer kinetochores. Furthermore, I analyzed the occurrence of an angle between the line drawn through sister kinetochores and the line perpendicular to the equatorial plate named β angle. The β angle greater than 30° appears close to mitotic spindle center. Interkinetochore distance and β angle are negatively correlated. Lastly, transient expression of kinesin-8 reduces degree of sister kinetochores oscillation in metaphase of mitosis.

(60 pages, 32 figures, 2 tables, 64 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library

Key words: dynamics, metaphase, kinesin-8 (Kif18A), oscillations, U2OS cells

Supervisor: Dr. sc. Iva Tolić, Prof.

Cosupervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Replacement: Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 10 May 2017

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Organizacija staničnog ciklusa.....	1
1.2. Regulacija staničnog ciklusa.....	2
1.3. Mitoza ili podjela stanične jezgre.....	6
1.4. Citoskelet i mikrotubuli.....	8
1.5. Centrosom.....	10
1.6. Diobeno vreteno.....	10
1.7. Motorni proteini.....	14
1.8. Kinezin-8.....	17
1.9. Modeli dinamike i oscilatornih kretanja kinetohora.....	20
1.10. Fluorescencijska mikroskopija.....	24
1.11. Cilj istraživanja.....	24
2. MATERIJALI I METODE.....	27
2.1. Stanična kultura.....	27
2.2. Transfekcija i priprema uzoraka za mikroskopiranje.....	28
2.3. Mikroskopiranje živih stanica.....	29
2.4. Kvantitativno obrađivanje i analiziranje snimaka.....	30
2.5. Parametar DAP.....	33
3. REZULTATI.....	34
3.1. Sestrinske kinetohore dinamički se kreću u oscilatornom obrascu prema ekvatorijalnoj ravnini u metafazi.....	34
3.2. Stupanj oscilacija smanjuje se pred anafazu.....	37
3.3. Negativna korelacija međukinetohorne udaljenosti i kuta β	41
3.4. Kinezin-8 se akumulira u gradijentnom obrascu poput komete na kinetohornim vlaknima.....	45
3.5. Prolazna ekspresija smanjuje stupanj oscilacija i smanjuje duljinu diobenog vretena stanica U2OS.....	45
4. RASPRAVA.....	49
5. ZAKLJUČAK.....	53
6. LITERATURA.....	54
7. ŽIVOTOPIS.....	60

1. UVOD

1.1. Organizacija staničnog ciklusa

Svi današnji živi organizmi nastali su od zajedničkog pretka prije najmanje 3,8 milijardi godina. Sve do danas zadržao se kontinuitet života (engl. *continuity of life*) ponavljanjem ciklusa rasta i podjele stanica. Važan dio kontinuiteta života je udvostručenje genoma stanice-majke kako bi svaka stanica-kćer dobila jednaku i potpunu kopiju genoma. Periodičko ponavljanje udvostručenja i podjele genetskog materijala naziva se stanični ciklus. Eukariotske stanice razvile su kompleksnu mrežu regulatornih proteina koji kontroliraju napredovanje kroz stanični ciklus.

Stanični ciklus eukariotskih stanica može se podijeliti u četiri faze, a to su: G1, S, G2 i M-faza (Slika 1). Replikacija DNA odvija se u S-fazi (S od engl. *DNA synthesis*) koja traje oko 10-12 sati. Podjela kromosoma i stanice odvija se u M fazi (M od engl. *mitosis*) koja traje manje od jednog sata. S i M-faza odjeljene su G-fazama (G od engl. *gap*) u kojima stanica raste i priprema se za sljedeću fazu kojoj prethodi. G1-faza prethodi S-fazi, a G2-faza prethodi M-fazi. Zajednički naziv za G1, S i G2-fazu je interfaza. Tijekom M faze ključna su dva procesa: mitozu i citokinezu. Mitoza ili dioba stanične jezgre (engl. *nuclear division*) je proces raspodjele udvostručenih kromosoma stanicama-kćerima, a citokineza ili dioba stanice (engl. *cytoplasmic division*) je podjela cijele stanice. Zajedno sa udvostručenjem genoma, unutar stanice se također udvostručuju i ostali stanični organeli i makromolekule koje nasljeđuju stanice-kćeri.

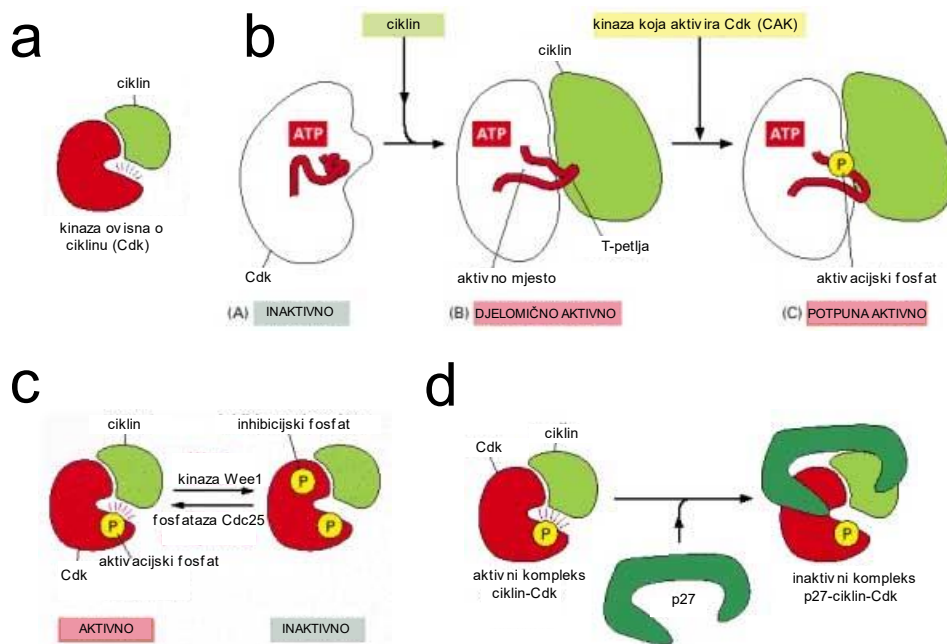


Slika 1. **Stanični ciklus.** Stanični ciklus eukariotskih stanica može se podijeliti u četiri faze: G₁, S, G₂ i M-faza. Ključni procesi u staničnom ciklusu, kao što su replikacija DNA, mitozu i citokinezu, regulirani su kontrolnim točkama. Analogno satu, kontrolni sustav središnji je dio staničnog ciklusa koji potiče nužne procese vremenski uvijek istim redoslijedom (preuzeto i preuređeno prema: Alberts i sur., 2007).

1.2. Regulacija staničnog ciklusa

Regulacija staničnog ciklusa visoko je konzervirana tijekom evolucije. Prvi proteini koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa pojavljuju se prije više od milijardu godina. Različiti unutarstanični i izvanstanični signali reguliraju napredovanje kroz stanični ciklus. Glavni regulatori napredovanja kroz stanični ciklus su članovi obitelji protein-kinaza nazvani Cdk (kinaze ovisne o ciklinima engl. *cyclin-dependent kinases*). Aktivne Cdk fosforiliraju različite unutarstanične ciljane proteine, te na taj način potiču i reguliraju različite događaje tijekom staničnog ciklusa. Razina se Cdk ne mijenja tijekom staničnog ciklusa, dok se njihova aktivnost mijenja. Aktivnost Cdk regulirana je preko četiri molekularna mehanizma (Slika 2). Samostalno u stanici Cdk je inaktivan, sve dok se ne aktivira jednim od molekularnih mehanizama. Prvi mehanizam uključuje spajanje Cdk sa svojim ciklinskim partnerom. Porodicu proteina ciklina, koji određuju aktivnost Cdk,

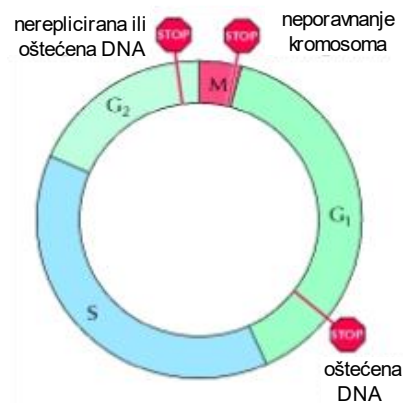
možemo podijeliti u četiri razreda: G1-ciklini, G1/S-ciklini, S-ciklini i M-ciklini. Kod različitih svojih organizama postoji različita nomenklatura pojedinačnih ciklina. Razina ciklina stalno se mijenja tijekom staničnog ciklusa tj. ciklini se periodički akumuliraju i degradiraju. Protein-kinaze su djelomično aktivne kada su ciklini čvrsto povezani na njih. Drugi mehanizam uključuje aktivirajuću fosforilaciju Cdk koju katalizira enzim nazvan CAK (kinaza koja aktivira Cdk, engl. *Cdk-activating kinase*). Fosforilacija Cdk, koju katalizira CAK u blizini aktivnog mjesta enzima, uzrokuje malu konformacijsku promjenu koja povećava aktivnost Cdk. Treći mehanizam regulacije Cdk uključuje inhibitornu fosforilaciju, što katalizira protein-kinaza Wee1. Cdk se može ponovno aktivirati defosforilacijom istog mjesta pomoću protein-fosfataze iz obitelji Cdc25. Četvrti mehanizam uključuje povezivanje s inhibitorima Cdk (CKI) koji potiču veliku konformacijsku promjenu u strukturi aktivnog mjesta i inaktiviraju Cdk.



Slika 2. Strukturne osnove regulacije staničnog ciklusa regulacijom aktivnosti protein-kinaze Cdk. (a) Mehanizam vezanja ciklinskog partnera djelomično aktivira Cdk. Formirani kompleks ciklin-Cdk dalje fosforilira ciljne proteine. Ako nije vezan ciklinski partner, Cdk je inativan. (b) Prikazana su tri stanja aktivnosti protein-kinaze Cdk te lokacija vezanja molekule ATP. (A) Prvo je inaktivno stanje kada ciklin nije vezan na Cdk, aktivno mjesto je blokirano regijom proteina nazvanom T-petlja (crveno). (B) Vezanjem ciklina T-petlja se premješta iz aktivnog mjesta, što rezultira djelomičnoj aktivnosti Cdk. (C) Nadalje, aktivacijska fosforilacija pomoću protein-kinaze CAK mjenja poziciju T-petlje što dodatno aktivira Cdk povećavajući afinitet vezanja na ciljne proteine. (c) Kompleks ciklin-Cdk može se inhibirati dodatnom fosforilacijom koju katalizira kinaza Wee1, te se može ponovno aktivirati defosforilacijom istog mjesta koju katalizira fosfataza Cdc25. (d) Inhibicija aktivnosti kompleksa ciklin-Cdk vezanjem inhibitora CKI p27 (preuzeto i preuređeno prema: Alberts i sur., 2007).

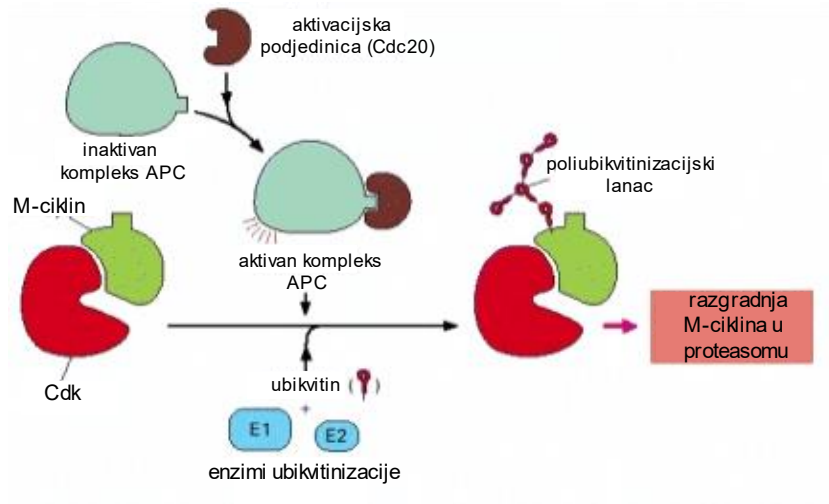
U staničnom ciklusu postoje tri glavne kontrolne točke (Slika 3). U kasnoj G1-fazi je prva kontrolna točka staničnog ciklusa nazvana START (kod kvasaca) ili restriksijska točka (kod sisavaca). Ako su izvanstanični uvjeti povoljni za stanicu, stanica prolazi kontrolnu točku te je dopuštena replikacija DNA. Druga G2/M kontrolna točka ne dopušta ulazak u mitozu dok se genom potpuno ne udvostruči. Provjerava jesu li izvanstanični uvjeti povoljni za ulazak u mitozu te postoje li oštećenja DNA. Kontrolni mehanizam potiče rane događaje u mitozu koji vode do poravnanja kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini u

metafazi. Treća kontrolna točka u M-fazi regulira prelazak iz metafaze u anafazu. Naziva se još i SAC (kontrolna točka diobenog vretena engl. *spindle assembly checkpoint*). Provjerava jesu li sve sestrinske kromatide pravilno orijentirane prema suprotnim polovima diobenog vretena. Ako su uvjeti kontrolne točke zadovoljeni, stanica nastavlja progresiju kasnih događaja u mitozu.



Slika 3. Kontrolne točke staničnog ciklusa. Kontrolne točke staničnog ciklusa osiguravaju pravilnu i kompletnu podjelu genoma stanicama-kćerima. Prva kontrolna točka u G₁-fazi provjerava postoje li oštećenja DNA. Druga kontrolna točka u G₂-fazi provjerava je li DNA potpuno replicirana i postoje li oštećenja DNA. Treća kontrolna točka u M-fazi provjerava poravnanje kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini. Ako uvjeti kontrolnog mehanizma nisu zadovoljeni, stanični ciklus je zaustavljen u kontrolnoj točki i odgađa započinjanje sljedeće faze staničnog ciklusa (preuzeto i preuređeno prema: Cooper i sur., 2004).

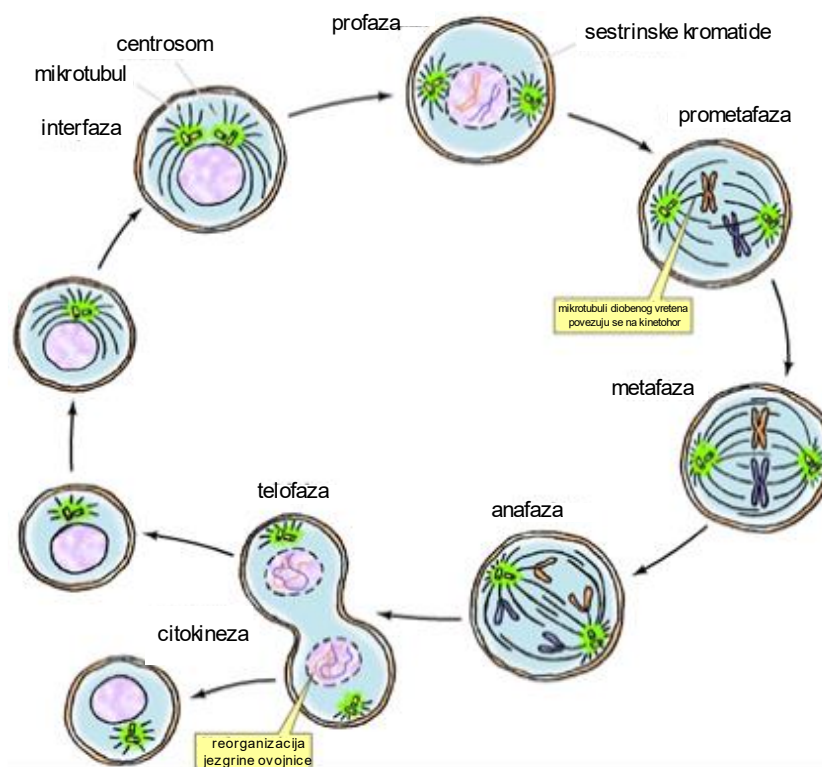
Tijekom staničnog ciklusa ključnu ulogu u regulaciji imaju periodičke proteolize specifičnih proteina. Ključnu ulogu u proteolizi tih specifičnih proteina ima ubikvitin-ligaza APC/C (kompleks koji potiče anafazu engl. anaphase promoting complex or cyclosome). Ubikvitin-ligaza APC/C proteolitički razgrađuje sekurin te tako omogućuje razdvajanje sestrinskih kromatida u anafazi. Također, proteolitički razgrađuje S- i M-cikline što inaktivira većinu kinaza Cdk u stanici uzrokujući tako globalnu defosforilaciju nakon metafaze. Aktivnost ubikvitin-ligaze APC/C regulirana je preko njenih aktivirajućih podjedinica Cdc20 tijekom anafaze i Cdh1 od kasne mitoze do rane G₁ faze (Slika 4).



Slika 4. **Regulacija aktivacije ubikvitin-ligaze APC/C.** Ubikvitin-ligaza ključni je regulator napredovanja iz metafaze u anafazu. Kompleks APC/C reguliran je preko aktivacijske podjedinice Cdc20 koja pomaže u prepoznavanju aminokiselinske sekvence M-ciklina i drugih ciljnih proteina. Dodatni proteini E1 i E2 pomažu u dodavanju molekula ubikvitina na ciljni protein (preuzeto i preuređeno prema: Alberts i sur., 2007).

1.3. Mitoza ili podjela stanične jezgre

Tijekom M-faze udvostručeni kromosomi se podijele na dvije pojedinačne jezgre (mitoza), a zatim se cijeli stanični sadržaj podijeli na dvije stanice-kćeri (citokineza). Mitozu obično dijelimo u pet faza, a to su: profaza, prometafaza, metafaza, anafaza i telofaza (Slika 5). Tijekom profaze kromosomi se kondenziraju i centrosomi se kreću na suprotne strane jezgre. Započinje formiranje diobenog vretena. Tijekom prometafaze mikrotubuli diobenog vretena vežu se na kinetohore kondenziranih kromosoma te dolazi do deorganizacije jezgrine ovojnice. Kada se sestrinske kromatide pravilno orijentiraju prema suprotnim polovima, započinju dinamičke oscilacije kromosoma sve do pravilnog poravnanja u ekvatorijalnoj ravnini. Pravilno poravnanje kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini odvija se u metafazi. Stanica se zadržava u metafazi sve dok nisu zadovoljeni uvjeti kontrolne točke u M-fazi. U anafazi dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida. Sestrinske kromatide kreću se prema suprotnim polovima u anafazi A, te se polovi odvajaju jedan od drugog u anafazi B. Tijekom telofaze kromosomi se dekonenziraju oko polova te se ponovno reorganizira jezgrina ovojnica oko pojedinog seta kromosoma. Proces podjele citoplazme (citokineza) započinje formiranjem kontraktilnog prstena, koji se sastoji od aktinskih vlakana i miozina II, još tijekom anafaze.



Slika 5. **Faze mitoze.** Tijekom profaze kromosomi se kondenziraju i centrosomi se kreću prema suprotnim stranama jezgre. Započinje formiranje diobenog vretena. Dolazi do deorganizacije jezgrine ovojnice i povezivanja mikrotubula na kinetohore kromosoma. Tijekom prometafaze kromosomi se dinamički kreću sve do poravnanja u ekvatorijalnoj ravnini (metafaza). U anafazi dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida i odmicanja polova diobenog vretena. Mitoza završava ponovnom reorganizacijom jezgrine ovojnice i dekondenzacijom kromosoma u telofazi. Proces citokineze dijeli dvije stanice koje ulaze u interfazu. Svaka stanica nasljeđuje jedan centrosom koji se duplicira prije sljedeće mitoze (preuzeto i preuređeno prema: Cooper i sur., 2004).

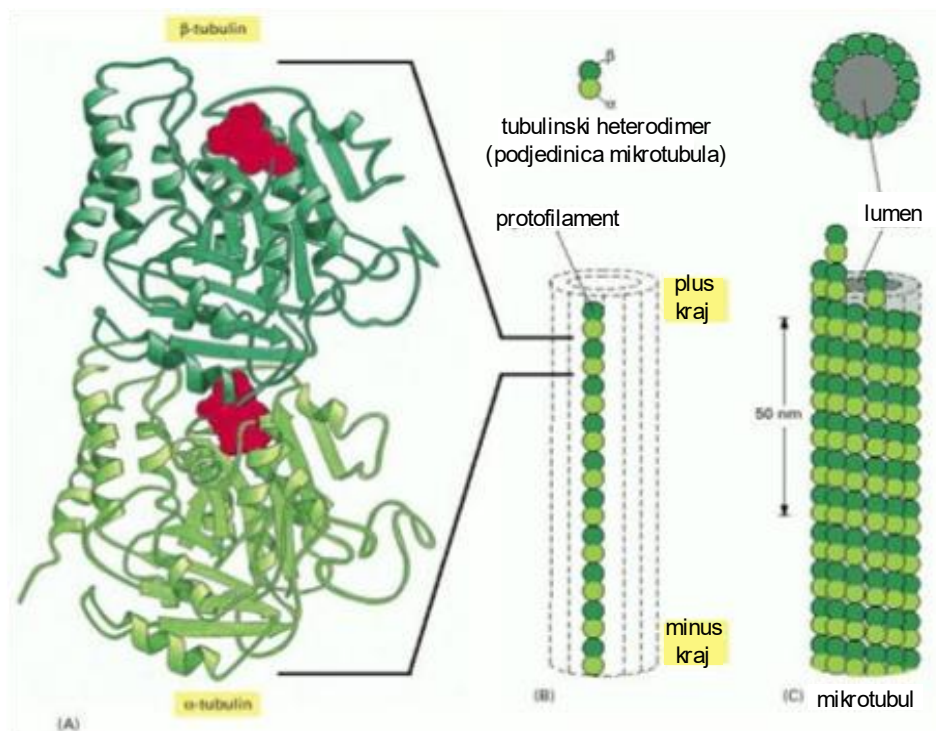
Prema komponentama regulacije staničnog ciklusa, mitozu možemo podijeliti na dva dijela. Prvi događaji u ranoj mitozu (profaza, prometafaza i metafaza) potaknuti su kontrolnom točkom u G2/M fazi i akumulacijom M-ciklina. Kompleks M-ciklin-Cdk fosforilira različite ciljne proteine koji dovode do formiranja diobenog vretena i poravnanja kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini. Događaji u ranoj mitozu regulirani su sa još dvije dodatne porodice protein-kinaza, Polo-kinaze i Aurora-kinaze, koje su regulirane fosforilacijom koju katalizira kompleks M-ciklin-Cdk. Polo-kinaza Plk ključna

je za normalno formiranje diobenog vretena, kinaza Aurora-A kontrolira proteine koji sudjeluju u formiranju i stabilizaciji diobenog vretena, a kinaza Aurora-B kontrolira povezivanje sestrinskih kromatida na diobeno vreteno. Drugi događaji u kasnoj mitozu započinju prijelazom iz metafaze u anafazu, kada kompleks APC/C potiče razgradnju komponenti kompleksa kohezina i odvajanje sestrinskih kromatida. Kompleks APC/C također potiče razgradnju ciklina koja vodi do inaktivacije kinaza Cdk i defosforilacije Cdk ciljnih proteina, što dovodi do završavanja anafaze, reorganizacije mikrotubula diobenog vretena i podjele cijele stanice procesom citokineze. Nadalje, kinaza Aurora B ključni je protein koji regulira i mehanizam prepoznavanja sile napetosti između sestrinskih kinetohora (engl. *tension-sensing mechanism*) na kinetohornom kompleksu. Prilikom povezivanja sestrinskih kromatida na suprotne polove, ključnu ulogu imaju orijentacija leđa-o-leđa sestrinskih kinetohora i sile napetosti. Sile napetosti koje se uspostavljaju u blizini kinetohore destabiliziraju nepravilno povezivanje sestrinskih kinetohora. Kada dođe do pravilnog povezivanja Aurora B smanjuje fosforilaciju kinetohore povećavajući stabilnost mjesta vezanja. Sve do pravilnog povezivanja zadnjeg sestrinskog kinetohornog para, nepravilno povezane kinetohore šalju negativni signal koji blokira aktivaciju Cdc20-APC/C blokirajući tako prijelaz iz metafaze u anafazu. Skoufias i suradnici (2001) pokazali su kako je prepoznavanje povezanosti sestrinskih kinetohora na suprotne polove i prepoznavanje sile napetosti između sestrinskih kinetohora u kontrolnoj točki SAC posredovano proteinima Mad2 i Bub1. Protein Mad2 preko interakcije s Cdc20 regulira aktivnost kompleksa APC/C (Amon, 1999; Welburn i sur., 2011), dok protein Bub1 prepoznaje uspostavljenu silu napetosti između sestrinskih kinetohora i povezuje se s Cdc20 neovisno proteina Mad2 (Tang i sur., 2001).

1.4. Citoskelet i mikrotubuli

Citoskelet čini strukturnu okosnicu stanice, određuje oblik stanice i opću organizaciju citoplazme. Citoskelet je odgovoran za kretanje cijele stanice, unutrašnji transport organela i ostalih struktura (npr. mitotskih kromosoma) kroz citoplazmu. Sastoji se od triju osnovnih tipova proteinskih vlakana: aktinskih, intermedijarnih vlakana i mikrotubula. Mikrotubuli su dugi šuplji čvrsti cilindri, vanjskog dijametra 25 nm i unutarnjeg dijametra 15 nm. To su polimeri građeni od puno jednostavnih monomernih podjedinica, globularnih proteina tubulina. Tubulin je heterodimerni protein sastavljen od dva blisko srodna polipeptida, α -tubulina i β -tubulina. Mikrotubuli nastaju

polimerizacijom tubulinskih dimera koji izgrađuju 13 lateralno povezanih linearnih protofilamenata (Slika 6).



Slika 6. Struktura mikrotubula i njegovih podjedinica. (A) Tubulinski heterodimer je podjedinica svakog protofilamenta koja nastaje čvrstim povezivanjem α -tubulina i β -tubulina. Dok je molekula GTP čvrsto povezana na α -tubulin, na β -tubulin je slabije povezana te sudjeluje u dinamici mikrotubula. Nukleotidi GTP prikazani su crvenom bojom. (B) Jedna podjedinica mikrotubula (tubulinski heterodimer) i jedan protofilament. Tubulinski heterodimeri jednako su orijentirani u svakom protofilamentu. (C) Mikrotubul je čvrsta cilindrična struktura izgrađena od 13 paralelnih i lateralno povezanih protofilamenata (preuzeto i preuređeno prema: Alberts i sur., 2007).

Važno svojstvo mikrotubula je strukturna polarnost. Polarnost mikrotubula proizlazi iz usmjerenog slaganja α - β heterodimera u protofilamentu. β -tubulin uvijek je okrenut prema plus kraju. Strukturna polarnost mikrotubula dovodi do različite stope asocijacije i disocijacije na krajevima mikrotubula. Plus kraj mikrotubula je dinamičniji, brže raste i brže se skraćuje od minus kraja. Svaki α - i β -tubulin veže na sebe jednu molekulu GTP. Dok se na α -tubulinu GTP nikad ne hidrolizira niti izmjenjuje, hidroliza GTP u GDP na β -tubulinu ima važnu ulogu u dinamici mikrotubula. Do hidrolize GTP dolazi tijekom ili

ubrzo nakon polimerizacije, što slabi afinitet vezanja tubulina za susjedne molekule, potičući tako depolimerizaciju. Dok god je dodavanje novih molekula tubulina, vezanih za GTP, brže od hidrolize GTP, mikrotubul zadržava kapicu sačinjenu od GTP molekula na svom plus kraju i rast mikrotubula se nastavlja. Ako se brzina polimerizacije smanji, dolazi do hidrolize GTP na tubulinu na vrhu plus kraja mikrotubula, što rezultira depolimerizacijom mikrotubula. Dolazi do odvajanja tubulina vezanih za GDP i skraćivanja mikrotubula. Strukturna polarnost također je značajna jer određuje smjer pokreta molekularnih motora duž mikrotubula. Kod evolucijski starijih organizama, mikrotubuli isključivo imaju ulogu u sastavljanju diobenog vretena, što ukazuje kako su se prvotno razvili za funkciju mitoze (Imoto i sur., 2011).

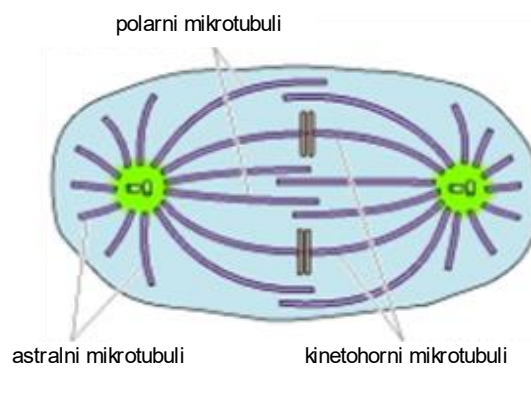
1.5. Centrosom

Unutar većine životinjskih stanica glavno središte mikrotubularnog ustrojstva (MTOC engl. *microtubule organizing center*) je organel nazvan centrosom. Svaki centrosom se sastoji od amorfne pericentriolarne tvari (engl. *pericentriolar matrix*) koja okružuje jedan par centriola orijentiranih okomito jedan prema drugom. Brzorastući plus krajevi mikrotubula pružaju se prema van od centrosoma, dok su minus krajevi usidreni u centrosomu. Ključni protein u centrosomu je γ -tubulin koji je odgovoran za nukleaciju mikrotubula. Također važnu ulogu u organizaciji centrosoma imaju i motorni proteini povezani s mikrotubulima, proteini koji povezuju motorne proteine s centrosomom, strukturni proteini i regulatorni proteini staničnog ciklusa.

1.6. Diobeno vreteno

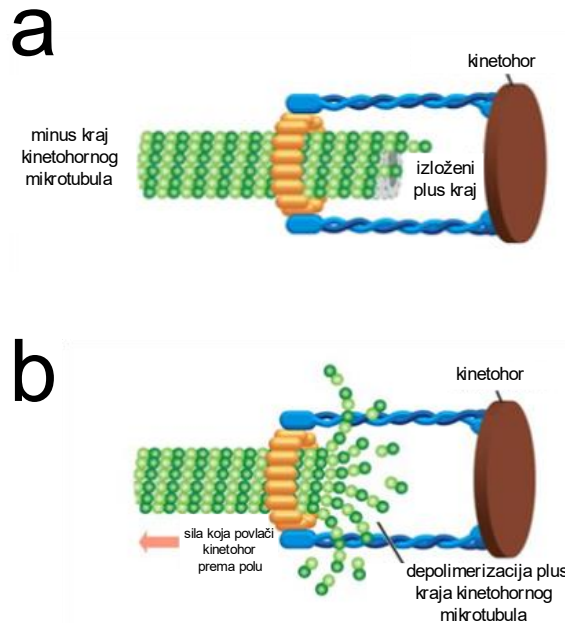
Diobeno vreteno odgovorno je za poravnanje i raspodjelu udvostručenih kromosoma. Centrosom se udvostručuje tijekom interfaze. Za vrijeme profaze udvostručeni centrosomi se odvajaju i pomiču prema suprotnim stranama jezgre. Dolazi do raspada jezgrine ovojnice, a mikrotubuli se reorganiziraju oblikujući mitotsko diobeno vreteno. Važnu ulogu u promjeni dinamike mikrotubula imaju proteini MAP (proteini povezani s mikrotubulima engl. *microtubule-associated proteins*). Do sada je otkriven velik broj proteina MAP koji imaju različite uloge, a regulirani su fosforilacijom nekoliko protein-kinaza. Članovi obitelji MAP, protein TOG/XMAP215 ima ulogu u stabilizaciji rastućeg plus kraja mikrotubula. Na početku mitoze proteini TOG/XMAP215 se inaktiviraju

fosforilacijom, te tako drastično mijenjaju dinamiku mikrotubula. Mikrotubuli tako postaju dostupni proteinima koji povećavaju frekvenciju katastrofe (npr. članovi obitelji kinezin-13). Rezultat toga je povećanje brzine razgradnje mikrotubula oko deset puta, što rezultira općom depolimerizacijom i skraćivanjem mikrotubula. Istovremeno se broj mikrotubula koji se šire iz centrosoma povećava za pet do deset puta. Takva promjena u dinamici na početku mitoze važna je za nastajanje diobenog vretena. Rezultat promjene je oslobađanje velikog broja kratkih mikrotubula iz centrosoma. Mikrotubule u diobenom vretenu možemo podijeliti na kinetohorne i nekinetohorne mikrotubule (Slika 7).



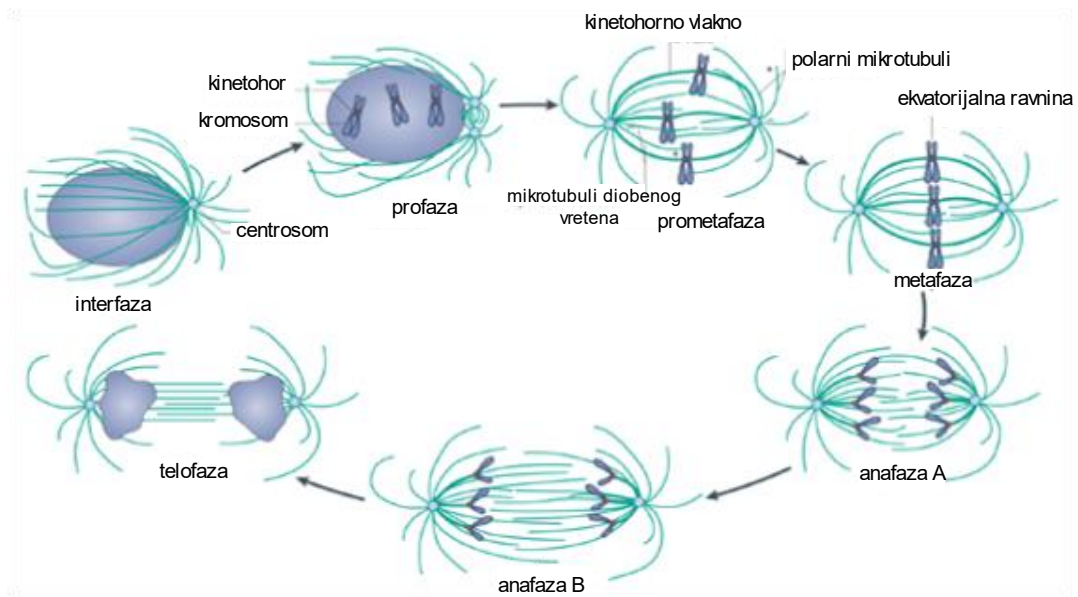
Slika 7. **Diobeno vreteno.** Mitotsko diobeno vreteno izgrađeno je od kinetohornih i nekinetohornih mikrotubula. Prikazani su kinetohorni, polarni i astralni mikrotubuli (preuzeto i preuređeno prema: Cooper i sur., 2004).

Kinetohorni mikrotubuli povezuju kondenzirane kromosome s polovima vretena. Plus krajevi kinetohornih mikrotubula povezuju se na kinetohore sestrinskih kromatida (Cheeseman i Desai, 2008). Pokazano je kako se na jedan kinetohorni kompleks kod stanica Hela povezuje oko 20 mikrotubula (Walczak i sur, 2010). Kinetohori su proteinski kompleksi koji se formiraju u centromernim regijama svake sestrinske kromatide te omogućuju povezivanje udvostručenih kromosoma na diobeno vreteno (Slika 8). Identificirano je više od 80 komponenti kinetohornog kompleksa (Cheeseman i Desai, 2008). Kinetohorni mikrotubuli stabiliziraju se kada se pričvrste na kinetohore (Nicklas, 1981).



Slika 8. **Mjesto vezanja mikrotubula na kinetohore.** (a) Proteini kinetohornog kompleksa okružuju mikrotubul. (b) Pritom je omogućena depolimerizacija plus kraja kinetohornog mikrotubula koja razgranjuje protofilamente. Razgranjeni protofilamenti uspostavljaju silu kojom se kinetohore povlače i kreću prema minus kraju (preuzeto i preuređeno prema: Alberts i sur., 2007).

Više kinetohornih mikrotubula može se paralelno povezati izgrađujući kinetohorno vlakno (k-vlakno). Također je pokazano kako kinetohorni kompleks ima sposobnost nukleiranja mikrotubula, te tako može samostalno formirati k-vlakno (Maiato, i sur., 2004). Polarni mikrotubuli povezuju polove diobenog vretena i stabilizirani su međusobnim preklapanjima u središtu diobenog vretena. Astralni mikrotubuli pružaju se prema periferiji stanice i postavljaju diobeno vreteno u sredini stanice (Slika 9).

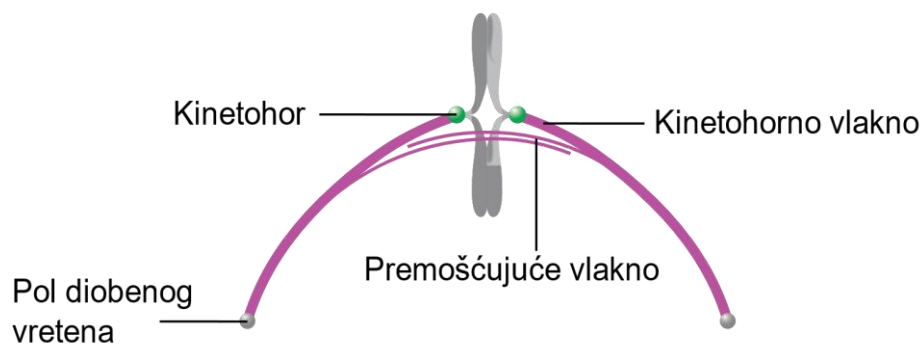


Slika 9. **Diobeno vreteno tijekom staničnog ciklusa.** Tijekom interfaze, većina kromatina je dekondezirana u jezgri, a mikrotubuli su organizirani u radijalnom obrascu iz centrosoma. Tijekom profaze, kromosomi se kondenziraju i centrosomi se udvostručuju. Raspad jezgrine ovojnice označava prijelaz iz profaze u prometafazu. Tijekom prometafaze kinetohorna vlakna (snop stabilnih mikrotubula) povezuju mikrotubule diobenog vretena s kinetohornim kompleksima na kromosomima. Zatim tijekom metafaze dolazi do poravnanja kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini. Polarni mikrotubuli svojim minus krajevima usidreni su u centrosomu, a plus krajevima formiraju antiparalelna preklapanja u ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena. Astralni mikrotubuli pružaju se iz centrosoma i plus krajevima povezuju se sa staničnim korteksom. Tijekom anafaze A kromosomi se kreću prema polovima, a tijekom anafaze B dolazi do razdvajanja polova diobenog vretena. Ponovno se reorganizira stanična jezgra i započinje dekondezacija DNA tijekom telofaze. Citokineza dijeli citoplazmu stanice te tako svaka jezgra-kćer se podijeli na dvije pojedinačne stanice koje ulaze u interfazu i započinje ciklus ponovo (preuzeto i preuređeno prema: Walczak i sur., 2010).

Također uočeni su i nekinetohorni mikrotubuli između sestrinskih kinetohora (Jansen, 1982; McDonald i sur., 1992; Ohi i sur., 2003), nazvani premošćujući mikrotubuli (engl. *bridging microtubules*), koji se povezuju antiparalelno i uravnotežuju međukinetohornu silu napetosti (Slika 10) (Kajtez i sur., 2016). Više povezanih premošćujućih mikrotubula izgrađuje premošćujuće vlakno (engl. *bridging fibre*) i povezuje susjedna kinetohorna

vlakna dozvoljavajući prisutnost sile napetosti i kompresije na pojedinačnom kinetohornom vlaknu (Kajtez i sur., 2016).

Dosadašnji model mitotskog diobenog vretena ne objašnjava prisutnost sile napetosti u blizini kinetohore i kompresije u blizini centrosoma na jednom kinetohornom vlaknu, što ukazuje kako postoji struktura koja uravnotežuje prisutne sile unutar diobenog vretena. Mikrodisekcija kinetohornog vlakna pokazala je povezanost kinetohornog vlakna i premošćujućeg vlakna (Kajtez i sur., 2016).

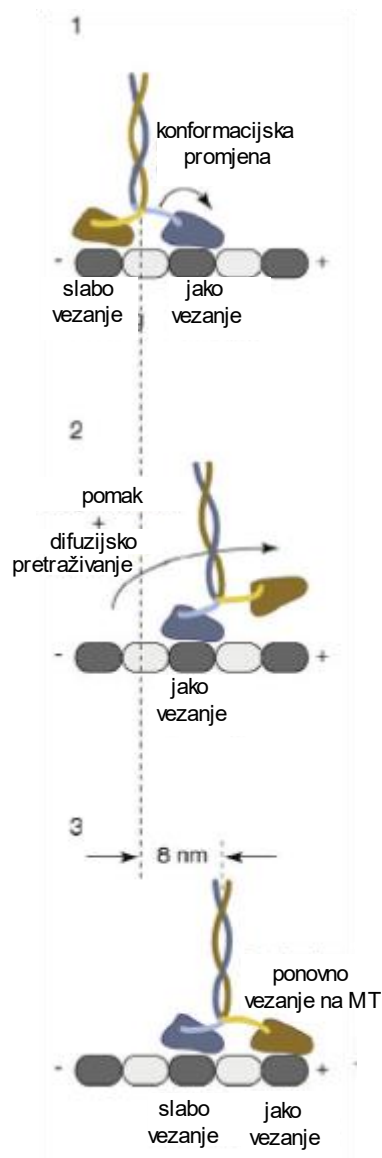


Slika 10. **Model jedinstvene strukture kinetohornog vlakna i premošćujućeg vlakna.** Prisutne sile napetosti i kompresije uravnotežene su postojanjem premošćujućeg vlakna.

1.7. Motorni proteini

Važnu ulogu u organizaciji i dinamici citoskeletnih vlakana ima velik broj pomoćnih proteina, motornih i nemotornih proteina. Motorni proteini su mali molekularni „strojevi“ koji prevode kemijsku energiju hidrolize molekule ATP u mehaničku energiju koja stvara snagu i pokret. Tako mogu prenositi organele po filamentima ili organizirati filamente međusobno. Miozini, kinezini i dineini motorni su proteini koji imaju ulogu u unutarstaničnoj organizaciji i prijenosu unutarstaničnih komponenti, kao što su mRNA i proteini (Titu i Gilbert, 1999; Hirokawa i Takemura, 2003). Kinezini i dineini imaju ulogu u prijenosu tereta po mikrotubulima i organizaciji mikrotubula u strukture kao što je diobeno vreteno (Sharp i sur., 2000). Mogu regulirati dinamiku mikrotubula. Dineini se kreću prema minus kraju, kinezini uglavnom prema plus kraju mikrotubula. Najbrži dinein kreće se po mikrotubulima brzinom od 14 $\mu\text{m/s}$. Brzina kretanja kinezina je od 0,02 do 2 $\mu\text{m/s}$. Kinezini su motorni proteini koji koriste energiju hidrolize molekule ATP

kako bi se kretali po mikrotubulu ili regulirali dinamiku mikrotubula (Vale i sur., 1996; Vale i sur., 1985). Opisano je 14 obitelji kinezina u kojima većina ima motornu domenu s ATPaznom aktivnošću, regiju dvostruke uzvojnice i domenu vezanja tereta (Lawrence i sur., 2004; Miki i sur., 2005). Većina kinezina ima motornu domenu na N-kraju proteina i kreće se prema plus-kraju mikrotubula, dok postoje kinezini koji imaju motornu domenu na C-kraju i kreću se prema minus kraju mikrotubula. Kinezini su uglavnom slične strukture. Izgrađeni su od dva teška lanca i dva laka lanca koji formiraju dvije domene motorne glave i repnu regiju dimeriziranu poput uzvojnice. Kreću se malim ponavljajućim koracima u kojima se domene motornih glava ponavljajući povezuju i otpuštaju sa mikrotubula (Slika 11). Motorne domene povezane su preko dugačke regije uzvojnice i periodički izmjenjuju pozicije u obrascu ruka-preko-ruke (engl. *hand-over-hand motion*).



Slika 11. **Model koračanja kinezina.** (1) Stražnja glava je povezana na mikrotubul i s molekulom ATP, dok je prednja glava povezana na mikrotubul i s molekulom ADP. (2) Kada dođe do izmjene molekule ATP za ADP na stražnjoj domeni motorne glave dolazi do njenog pomicanja prema prednjoj domeni. (3) Daljnjim vezanjem molekule ATP na donju povezanu domenu dolazi do konformacijske promjene koja mijenja položaj gornje nepovezane domene. Ta promjena potakne gornju nepovezanu domenu ispred donje povezane domene. Dok stražnja glava prijeđe put od 16 nm, centar mase kinezina pomakne se za 8 nm (preuzeto i preuređeno prema: Gennerich i Vale, 2009).

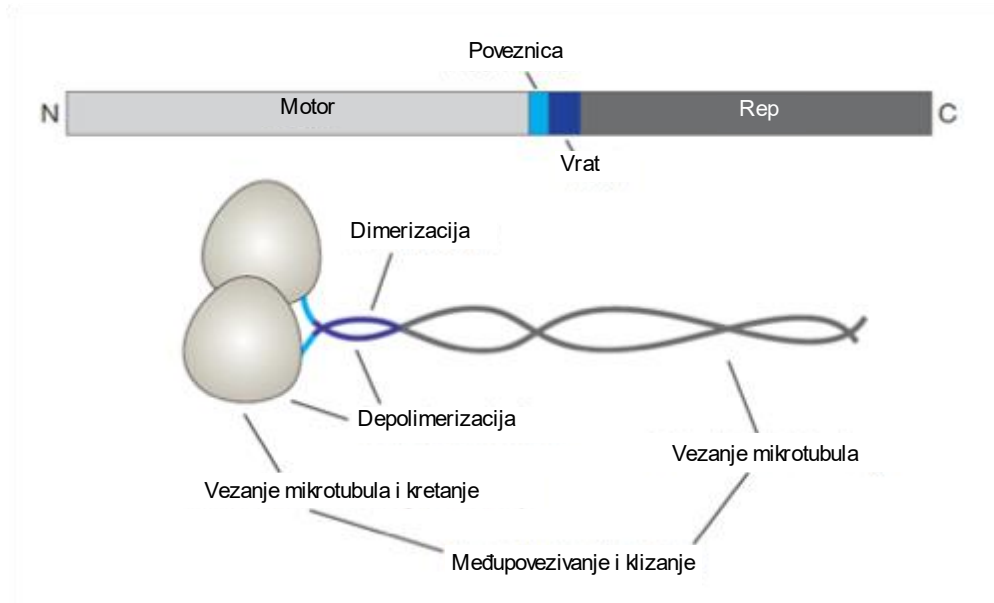
Obitelji kinezina imaju različite strukture i uloge. Naprimjer, kinezin-5 je tetramerni protein u kojem su dva dimera povezana preko domena repa tako da su motorne domene postavljene suprotno jedna od druge. Jedan dimer je vezan na jedan mikrotubul, dok je

drugi dimer vezan za drugi mikrotubul (Kapitein i sur., 2005) i ima ulogu u formiranju pravilnog diobenog vretena (Slangly i sur., 1995). Kinezin-1 ima motornu domenu na N-kraju i sudjeluje u pomicanju organela, a kinezin-3 je monomerni protein i također sudjeluje u pomicanju organela. Kinezin-14 ima motornu domenu na C-kraju i kreće se prema minus kraju mikrotubula. Nadalje, rezultati više istraživanja pokazali su važnost enzima kinezina-13 i kinezina-8 koji depolimeriziraju mikrotubule. Kinezin-13 ima depolimeraznu aktivnost i nema motornu aktivnost po mikrotubulu. Dok kinezin-8 ima i depolimeraznu i motornu aktivnost prema plus kraju mikrotubula.

1.8. Kinezin-8

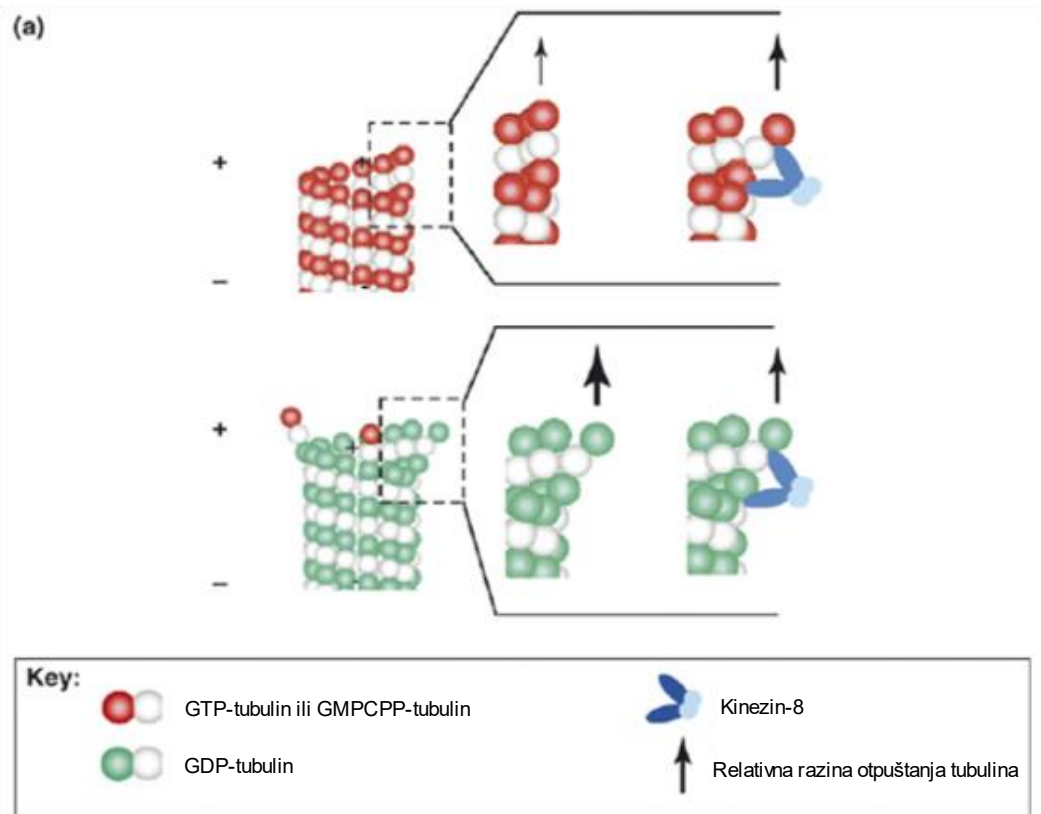
Obitelj proteina kinezina-8 uključuje članove Kif18A, Kif18B i Kif19 (*H. sapiens*), Klp5 i Klp6 (*S. pombe*), Kip3 (*S. cerevisiae*), Klp67A (*D. melanogaster*), KipB (*A. nidulans*) (Lawrence i sur., 2004; Vicente i Wordeman, 2015). Članovi obitelji kinezina-8 imaju ulogu u interakciji između mikrotubula i staničnog korteksa, pozicioniranju mitohondrija u stanici, u normalnom formiranju diobenog vretena i dinamici kinetohora (Pereira i sur., 1997; Rischitor i sur., 2004; Tytell i sur., 2006; Zhu i sur., 2005).

Molekularna masa kinezina-8 (Kif18A) iznosi 100 kDa (Luboshits i Benayahu, 2005). Kinezin-8 ima motornu domenu na N-kraju koja ima i depolimerizacijsku aktivnost, dok na C-kraju je domena koja veže mikrotubul (Slika 12) (Stumpff i sur., 2011).



Slika 12. **Struktura kinezina-8 (Kip3)**. Prikaz strukturnih domena i njihovih uloga (preuzeto i preuređeno prema: Roostalu i Surrey, 2013).

Motorna domena kinezina-8 pokazuje visoku procesivnost koja mu omogućuje akumulaciju na plus kraju duljih mikrotubula, te je na taj način omogućena depolimerizacijska aktivnost duljih mikrotubula (Varga i sur., 2006; Varga i sur., 2009). Kinezin-8 utječe na kinetiku mikrotubula i otpuštanje tubulinskih dimera s vrha plus kraja mikrotubula (Slika 13) (Garcia i sur., 2002; Gupta i sur., 2006). Kinezin-8 ima sporu motornu aktivnost. Rezultati su pokazali kako brzina kinezina-8 iznosi $0,02 \pm 0,007 \mu\text{m/s}$ kod stanične linije HeLa (Mayr i sur., 2007) i $3,2 \pm 0,3 \mu\text{m/min}$ kod pupajućeg kvasca (Varga i sur., 2009). Kreće se prema plus kraju i depolimerizira stabilne mikrotubule u ovisnosti o duljini mikrotubula, što je pokazano rezultatima više istraživanja u uvjetima *in vitro* (Varga i sur., 2006; Mayr i sur., 2007; Du i sur., 2010; Erent i sur., 2012; Grissom i sur., 2009) i *in vivo* na kvascu (Garcia i sur., 2002; West i sur., 2002; Gupta i sur., 2006; Tischer i sur., 2009) i na ljudskim stanicama (Mayr i sur., 2007; Stumpff i sur., 2008).



Slika 13. **Mehanizam skraćivanja mikrotubula pomoću kinezina-8.** (gornji prikaz) Skraćivanje mikrotubula *in vitro* je brže u prisutnosti kinezina-8. Mikrotubuli GMPCPP korišteni u *in vitro* eksperimentima su veliku osjetljivost na mehaničku destabilizaciju vrha posredovanu razgranjenjem protofilamenta, (donji prikaz) dok skraćivanje *in vitro* je sporije uz prisutnost spontane depolimerizacije mikrotubula (preuzeto i preuređeno prema: Gardner i sur., 2008).

Varga i suradnici (2009) predložili su model koji opisuje nastanak koncentracijskog gradijenta kinezina-8 na mikrotubulu nazvan „antena model“ (engl. *antenna model*). Nakon što se kinezini-8 nasumično povežu na mikrotubule započinju kretanja prema plus kraju. Pojedinačni kinezin-8 zaustavlja se na vrhu mikrotubula sve dok ga nadolazeći kinezin-8 ne odgurne. Kinezin-8 se zatim otpušta i sa sobom uklanja prosječno jedan do dva tubulinska dimera. Ovakav kooperativni mehanizam depolimerizacije proporcionalan je protoku motora prema kraju mikrotubula. Konačan rezultat nastalog koncentracijskog gradijenta kinezina-8 je brža depolimerizacija duljih mikrotubula.

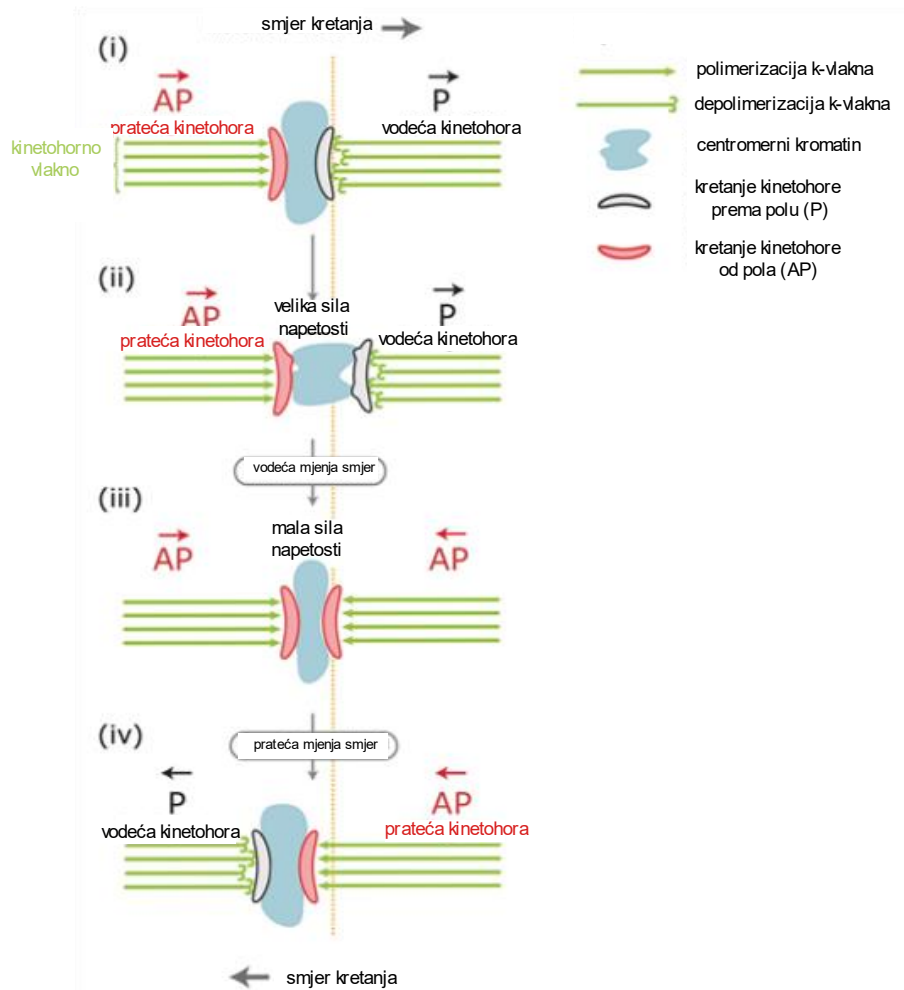
Kinezin-8 sudjeluje u poravnanju kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini (Cottingham i sur., 1997; DeZwaan i sur., 1997). Pokazano je kako kinezin-8 ima ključnu ulogu u kontroli oscilatornih kretanja kinetohora te pri tome suprimira kretanje kinetohora, smanjuje amplitudu i brzinu metafaznih oscilacija (Du i sur., 2010; Stumpff i sur., 2008). Kinezini-8 akumuliraju se u gradijentu oblika poput komete na gotovo svim kinetohornim mikrotubulima, te rezultati ukazuju kako je koncentracija Kif18A uvijek veća na jednoj kinetohori u odnosu na sestrinsku kinetohoru (Stumpff i sur., 2008). Akumulacija kinezina-8 je veća na kinetohornim mikrotubulima koji su periferno u odnosu na unutarnje mikrotubule bliže osi diobenog vretena (Stumpff i sur., 2008). Kinezin-8 povećava udaljenost između sestrinskih kinetohora, što sugerira kako taj motorni protein regulira sile napetosti između sestrinskih kinetohora (Garcia i sur., 2002; Mayr i sur., 2007; Stumpff i sur., 2008; West i sur., 2002).

1.9. Modeli dinamike i oscilatornih kretanja kinetohora

Kada se sestrinske kromatide povežu s bližim polom diobenog vretena, započinju dinamička kretanja kinetohornog para relativno konstantnom brzinom i učestalim promjenama smjera (Skibbens i sur., 1993; Waters i sur., 1996). Također pokazano kako je dinamika 15-20 mikrotubula povezanih u jedno kinetohorno vlakno koordinirana s kretanjima kinetohora (Inoue i Salmon, 1995). Povećanje duljine kinetohornog vlakna na plus kraju povezano je s kretanjem od bližeg pola (AP engl. *away-from-pole movements*), dok skraćivanje duljine povezano je s kretanjem prema bližem polu (P engl. *poleward movement*).

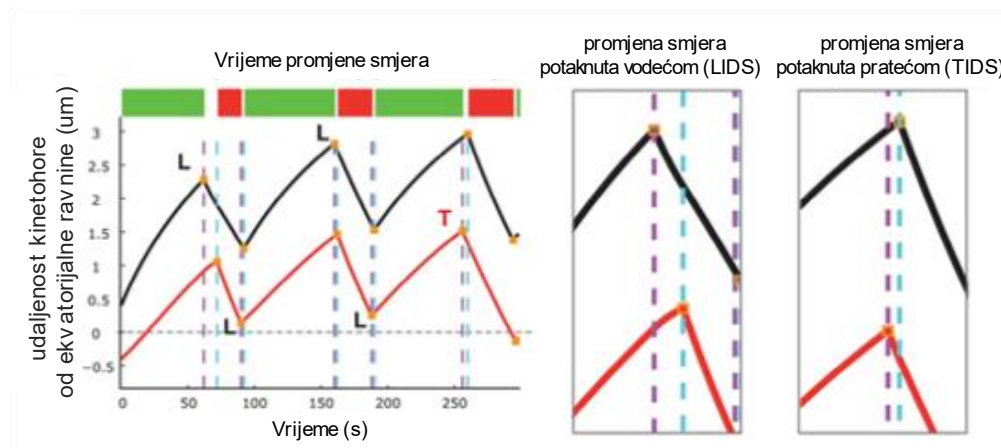
Model koji opisuje povezanost promjene smjera kretanja sestrinskog para kinetohora tijekom oscilatornih kretanja i sile napetosti nazvan je model održavanja sile napetosti (engl. *long-standing tension model*) (Slika 14). Model je opisan u nekoliko istraživanja s priloženom eksperimentalnim rezultatima (Rieder i Salmon, 1994; Skibbens i sur., 1995; Skibbens i sur., 1993; Wan i sur., 2012). Model definira vodeću kinetohoru (engl. *leading sister*) i prateću kinetohoru (engl. *trailing sister*). Vodeća kinetohora je kinetohora koja se kreće prema bližem polu diobenog vretena i njeno kinetohorno vlakno se skraćuje. Prateća kinetohora je druga kinetohora koja se kreće suprotno od bližeg pola diobenog vretena i njeno kinetohorno vlakno se produljuje. Model opisuje kako uvijek vodeća prva mijenja smjer kretanja, zatim tu promjenu prati prateća sestrinska kinetohora. Povećanjem udaljenosti između sestrinskih kinetohora dolazi do povećanja sile napetosti između

sestrinskog para. Kada dođe do maksimalne rastegnutosti, prisutna maksimalna sila napetosti potakne prvo promjenu smjera kretanja vodeće kinetohore. Zatim relaksacija, koja nastaje nakon promjene smjera kretanja vodeće, potakne promjenu smjera kretanja prateće kinetohore. Nakon promjene smjera kretanja, vodeća kinetohora postaje prateća, te iz kretanja prema bližem polu mijenja u smjer kretanja od bližeg pola diobenog vretena, i obrnuti je proces za prateću kinetohoru.



Slika 14. **Standardni model promjene smjera kretanja kinetohore.** Model održavanja sile napetosti opisuje kako sestrinske kinetohore mjenjaju smjer kretanja. Vodeća kinetohora (P, crno) kreće se prema bližem polu. Centromerni kromatin (plavo) s vremenom postaje rastegnutiji (i, ii). Rastegnutosť se pojavljuje zato što se prateća kinetohora, koja se kreće od bližeg pola (AP, crveno), kreće sporije od vodeće. Pri maksimalnoj rastegnutosťi, sila napetosti između sestrinskih kinetohora potakne vodeću kinetohoru na promjenu smjera iz kretanja prema u kretanje od pola (iz P u AP obrazac). (iii) Promjena smjera kretanja rezultira naglim smanjenjem sile napetosti na obje kinetohore te se obje kinetohore kreću jedna prema drugoj (obje u AP obrascu). Nastala relaksacija potakne prateću na promjenu smjera kretanja prema bližem polu (P-obrazac) (preuzeto i preuređeno prema: Burroughs i sur., 2015).

Nadalje, Burroughs i suradnici (2015) opisali su model sata sile napetosti (engl. *tension-clock model*) (Slika 15). Model pretpostavlja postojanje unutarnjeg reguliranog vremena promjene smjera kretanja kinetohora. Pokazano je kako ponekad i prateća kinetohora može mjenjati smjer kretanja prije vodeće sestrinske kinetohore. Definirali su tri događaja karakteristična za promjenu smjera kretanja: promjena smjera potaknuta vodećom (LIDS engl. *lead initiated directional switch*), promjena smjera potaknuta pratećom (TIDS engl. *trail initiated directional switch*) i zajednički potaknuta promjena smjera (JDS engl. *joint initiated directional switch*). Analizirano je 1549 sestrinskih kinetohora snimanjem 55 stanica te je učestalost promjene smjera potaknute vodećom 54,3%, pratećom 34,8%, a zajednički potaknuto je 10,9%. Ako sila napetosti padne nisko, promjenu smjera potiče prateća sestrinska kinetohora.



Slika 15. **Model sata sile napetosti.** Prikazane su oscilacije sestrinskih kinetohora u vremenu. Vremena promjene smjera prikazani su narančastim kružićima. Zeleno pokazuje stanje u kojem prva sestra depolimerizira, dok druga polimerizira, a crveno prikazuje stanje u kojem prva sestra polimerizira, dok druga depolimerizira. Promjene smjera kretanja prikazane su okomitim isprekidanim linijama. S obzirom koja sestrinska kinetohora potakne promjenu smjera, razlikujemo: promjena smjera potaknuta vodećom (LIDS), promjena smjera potaknuta pratećom (TIDS) i zajednički potaknuta promjena smjera (JDS). Vodoravnom sivom linijom prikazana je ekvatorijalna ravnina. Prikazani su uvećani događaji LIDS i TIDS (preuzeto i preuređeno prema: Burroughs i sur., 2015).

1.10. Fluorescencijska mikroskopija

Fluorescencijska mikroskopija osjetljiva je metoda istraživanja unutarstanične raspodjele molekula. Prilikom označavanja molekula fiksiranih i živih stanica koriste se fluorescentne boje. Fluorescentna boja apsorbira svjetlost jedne valne duljine, a emitira svjetlost druge valne duljine. Pri vizualizaciji koriste se filteri. Prvi filter dozvoljava osvjetljenje uzorka svjetlošću valne duljine koja pobuđuje fluorescentnu boju, dok drugi filter dopušta prolazak specifične valne duljine svjetlosti koju pritom emitira fluorescentna boja. Fluorescentne boje emitiraju svjetlost veće valne duljine nakon što budu pobuđene svjetlošću manje valne duljine. Neki od upotrebljivanih fluorescentnih oznaka su: FITC, rodamin, Texas red, AMCA, Cy3 i Cy5, GFP, RFP. Molekula GFP pogodna je za praćenje položaja i kretanja proteina u živim stanicama. Današnje metode rekombinantne DNA omogućuju vezanje molekule GFP za bilo koji odabrani protein. Konfokalna mikroskopija koristi značajke fluorescencijske mikroskopije. Zajedno s elektroničkom analizom i obradom slike postiže se dobivanje slika s više pojedinosti i jačeg kontrasta. Uski snop laserskog svjetla specifične valne duljine fokusira se na određenu dubinu uzorka. Emitirano svjetlo sakuplja detektor (videokamera). Prije nego emitirano svjetlo stigne do detektora, fluorescentno svjetlo emitirano s uzorka mora proći kroz konfokalnu aperturu. Konfokalna apertura je precizno smještena na mjestu gdje se svjetlo emitirano sa odabrane dubine uzorka nalazi u fokusu. Na taj način se detektira samo fokusirano svjetlo emitirano s odabrane dubine uzorka čime se postiže oštrija slika od dobivene slike standardnim fluorescencijskim mikroskopom. Serija slika dobivenih iz različitih dubina može poslužiti za rekonstrukciju trodimenzionalne strukture uzorka koji se ispituje.

1.11. Cilj istraživanja

U ovom diplomskom radu istražiti će se dinamika kinetohora i dinamika kinezina-8 u metafazi mitoze. Dinamika označava ritam odvijanja nekog procesa. Tijekom metafaze kromosomi se dinamički kreću u oscilatornom obrascu sve do poravnanja kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini. Oscilatorna kretanja kromosoma u metafazi karakteriziraju periodi kretanja prema bližem polu (engl. *poleward motion*) i od bližeg pola (engl. *away-from-pole motion*) koji su isprekidani promjenom smjera kretanja (Skibbens i sur., 1993). Za snimanje dinamike kinetohora korištena je stanična linija U2OS ljudskog osteosarkoma koja stabilno eksprimira α -tubulin obilježen crvenim fluorescentnim

proteinom mCherry, te centromerni protein A obilježen zelenim fluorescentnim proteinom GFP. Protein CENP-A je varijanta histona H3 u centromernoj regiji DNA. U istraživanjima se koristi kao marker centromere i kinetohore, dok će α -tubulin označiti diobeno vreteno. Za kvantitativnu analizu dinamike kinetohora praćene su pozicije kinetohora u vremenu i pozicije polova diobenog vretena. Dinamika kinetohora uključuje kvantifikaciju kretanja kinetohora, raspodjelu kinetohora u diobenom vretenu u odnosu na ekvatorijalnu ravninu i os diobenog vretena, kut β koji zatvara pravac koji prolazi kroz kinetohore i okomica na ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena te međukinetohorna udaljenost. Cilj istraživanja je istražiti dinamiku kinetohora i kinezina-8 u staničnoj liniji U2OS. Optimizacija postavki snimanja i kvantifikacija dinamike kinetohora i kinezina-8 u kontrolnoj grupi stanica U2OS pridonijet će uspostaviti sustava za daljnji rad i istraživanje. Dobiveni rezultati usporedit će se sa dosadašnjim istraživanjima provedenima na drugim staničnim linijama. Preko analiziranih parametara izračunat će se parametar DAP koji označava devijacija kinetohorne prosječne pozicije i određuje stupanj oscilacija kinetohora. Nadalje, stanice U2OS će biti snimane do ulaska u anafazu te će se utvrditi postoji li promjena u stupnju oscilacija u intervalima tijekom metafaze sve do anafaze.

Za snimanje dinamike kinezina-8 korišten je divlji tip stanične linije U2OS ljudskog osteosarkoma koji je transficiran plazmidnom DNA Kif18A-EGFP (pMX229) koji sadrži rekombinantni gen za kinezin-8 obilježen sa pojačanim zelenim fluorescentnim proteinom EGFP i dodanom bojom SiR-tubulin. Istraživanja su pokazala kako je koncentracija kinezina-8 (Kif18A) uvijek veća na jednoj kinetohori u odnosu na sestrinsku kinetohoru (Stumpff i sur., 2008). Dobiveni rezultati pozicije kinezina-8 u diobenom vretenu usporedit će se s dosadašnjim istraživanjima. Nadalje, praćenjem intenziteta kinezina-8 na sestrinskim kinetohorama želi se utvrditi postoji li korelacija između promjene smjera kretanja i promjene intenziteta kinezina-8 na kinetohornom vlaknu. Očekivano je smanjenje intenziteta kinezina-8 na vodećoj kinetohori koja se depolimerizira zajedno s povećanjem intenziteta kinezina-8 na pratećoj kinetohori. SiR-tubulin je fluorogenična boja bazirana na fluoroforu silikon-rodaminu (SiR) i molekuli koja se veže na mikrotubul decetaksel (Lukinavičius i sur., 2014). Fluorogenična boja SiR-tubulin omogućuje obilježavanje mikrotubula na živim stanicama sa visokom specifičnošću. Bojanje tubulina korišteno je za utvrđivanje faze mitoze i praćene pozicija polova diobenog vretena. Istražena dinamika pomoći će u daljnim koracima projekta, te razumjevanju mehanizma oscilacije kinetohora i regulacije sile napetosti između

sestrinskih kinetohora. Kvantifikacija dinamike u kontrolnoj grupi stanica pridonjet će daljnjem razvoju projekta „OSCITON“ (HRZZ) i razvoju fizičkog modela.

Ovim istraživanjem i kvantifikacijom dinamike kinetohora u kontrolnoj grupi U2OS stanica omogućit će usporedbu dinamike sa stanicama U2OS u kojima je smanjena ili pojačana ekspresija kinezina-8. Nadalje, metodom laserske mikrodisekcije istražiti će se osciliraju li kinetohore nakon laserske mikrodisekcije kinetohornog vlakna. U budućim koracima istražiti će se povezanost skraćivanja kinetohornog vlakna pomoću kinezina-8, koji utječe na sile napetosti između sestrinskih kinetohora, i uloge premošćujućih vlakana koji uravnotežuju prisutne sile na pojedinačnom kinetohornom vlaknu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Stanična kultura

Za snimanje dinamike kinetohora korištena je stanična linija U2OS ljudskog osteosarkoma koja stabilno eksprimira α -tubulin obilježen crvenim fluorescentnim proteinom mCherry, te centromerni protein A obilježen zelenim fluorescentnim proteinom GFP. Staničnu liniju konstruirali su dr. sc. Marin Barišić i dr. sc. Helder Maiato u Laboratoriju za biofiziku stanice (Institut za staničnu i molekularnu biologiju, Sveučilište u Portu, Portugal). Adherentna kultura stanica rasla je u posudi za uzgoj, u hranjivom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Basel, Switzerland) uz dodatak 10% temperaturno inaktiviranog telećeg fetalnog seruma (FBS, engl. *fetal bovine serum*) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geneticina (Life Technologies, Waltham, SAD), 100 I.U./mL penicilina (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Pripremljeni medij filtrira se prije korištenja.

Za snimanje dinamike kinezina-8 korišten je divlji tip stanične linije U2OS ljudskog osteosarkoma koji je transficiran plazmidnom DNA (pMX229) koja sadrži rekombinantni gen za kinezin-8 (Kif18A) fuzioniran sa sekvencom za pojačani zeleni fluorescentni protein EGFP (od engl. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP). Adherentna kultura stanica divljeg tipa U2OS rasla je u posudi za uzgoj stanica, u hranjivom mediju DMEM bez dodatka selektivnog antibiotika geneticina.

Kulture stanica su presađivane svakih 48-60 sati kada bi dosegle 80% konfluentnosti. Prvo se uklanja medij i ispire s 5 mL sterilnog fosfatnog pufera (engl. phosphate-buffered saline). Zatim se stanice odvajaju od podloge dodavanjem 1 mL 1%-tne otopine tripsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i inkubacijom 5 minuta. Odlijepljene stanice se pomiješaju s 2 mL medija i 300 μL homogene smjese dodajemo u novu posudu za uzgoj u koju smo prethodno dodali 10 mL svježeg DMEM hranjivog medija. Kulture stanica održavane su u inkubatoru (Galaxy 170s, Eppendorf, Hamburg, Germany) pri 37°C i 5% CO₂.

2.2. Transfekcija i priprema uzoraka za mikroskopiranje

Divlji tip stanične linije U2OS transficiran je plazmidnom DNA Kif18A-EGFP (pMX229) koja sadrži rekombinantni gen za kinezin-8 obilježen zelenim fluorescentnim proteinom EGFP (Stumpff i sur., 2008). Plazmid je konstruirala dr. sc. Linda Wordeman (University of Washington). Stanice su transficirane metodom elektroporacije korištenjem Nucleofector Kit R seta na Nucleofector 2b uređaju (Lonza, Basel, Switzerland). Korišten je program za staničnu liniju U2OS. Kada kultura stanica postigne 80% konfluentnosti, stanice se tripsiniziraju 5 minuta u inkubatoru. Brojanjem stanica u Bürker-Türkovoju komorici odvoji se volumen od milion stanica u epruvetu, te se centrifugira 5 minuta na 150 RCF na sobnoj temperaturi. Medij se uklanja i stanice se resuspendiraju u otopini koja sadrži 100 μ L Nucleofector reagenta i 1 μ g plazmidne DNA Kif18A-EGFP. Nakon elektroporacije na uređaju, smjesa se deaktivira s 0,5 mL hranjivog medija DMEM. U dvije male petrijeve posude za mikroskopiranje, sa staklenim dnom promjera 35 mm i debljine 1,5 mm (MatTek Corporation, Ashland, SAD), stavimo 1,5 mL DMEM hranjivog medija za uzgoj stanica. Transficirane stanice se nasade u posude za mikroskopiranje u dvije različite koncentracije. Pripremljene stanice se čuvaju u inkubatoru 24 do 48 sati prije mikroskopiranja. Osam sati prije mikroskopiranja transficiranih stanica, potrebno je ukloniti hranjivi medij DMEM i dodati 1,5 mL medija za mikroskopiranje L-15 (Leibovitz) (Life Technologies) u kojem je otopljena boja SiR-tubulin u 100 nM koncentraciji zajedno s inhibitorom verapamil u koncentraciji 10 μ M. Hranjivi medij L-15 pogodan je za mikroskopiranje zato što ne sadrži autofluorescentne indikatore kiselosti. Prethodno je pripremljen dodavanjem 10% temperaturno inaktiviranog FBS, 50 μ g/mL geneticina, 100 I.U./mL penicilina, 100 μ g/mL streptomicina.

Kultura stanica U2OS sa stabilnom ekspresijom mCherry- α -tubulin i CENP-A-GFP priprema se za mikroskopiranje prilikom presađivanja stanica. Homogenu smjesu DMEM medija i odljepljenih stanica dodajemo u različitim koncentracijama u petrijeve posude za mikroskopiranje u kojima je dodano 1,5 mL DMEM medija. Pripremljene stanice se čuvaju u inkubatoru te je potrebno 24 do 48 sati nakon nasadivanja zamjeniti medij DMEM sa 1,5 mL medija za mikroskopiranje L-15 (Leibovitz). Četiri do pet sati nakon dodavanja L-15 medija stanice su pogodne za mikroskopiranje.

2.3. Mikroskopiranje živih stanica

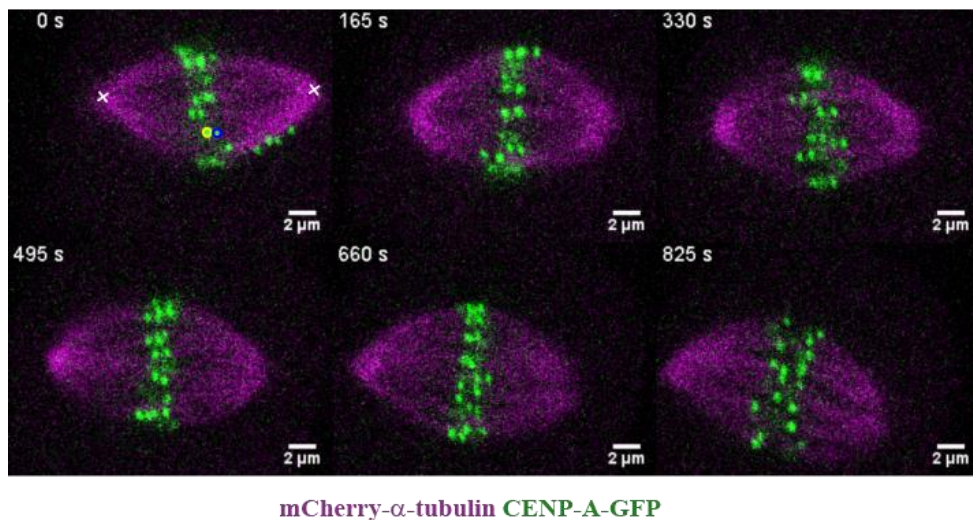
Stanice U2OS snimane su laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom. Sustav se sastoji od inverznog konfokalnog sistema Opterra I (Bruker Nano Surfaces, Middleton, SAD) koji je povezan s inverznim mikroskopom Nikon TI-E (Nikon, Tokyo, Japan). Za snimanje korišten je uljni imerzijski objektiv Nikon CFI Plan Apo VC 100x (Nikon, Tokyo, Japan) u komori za zagrijavanje Okolab Cage Incubator H301-K-frame (Okolab, Pozzuoli, Italija). U komori za zagrijavanje postavljena je temperatura od 37 °C koja je optimalna za djeljenje stanica. Sistem se kontrolira programom Prairie View Imaging 5.4 (Bruker).

Za snimanje stanica U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) korištene su pobudne laserske linije valnih duljina 488 nm i 561 nm. Snaga pobudnog lasera 488 nm je 15% za GFP, a snaga pobudnog lasera 561 nm je 35% za mCherry. Vrijeme pobuđivanja (engl. *exposure time*) je 100 ms, a veličina točkaste konfokalne aperture (engl. *pinhole aperture*) je 60 μ m. Snimano je četiri do šest središnjih ravnina horizontalno postavljenog diobenog vretena sa razmakom 0,5 μ m između ravnina. Vrijeme snimanja je svakih 15 sekundi.

Za snimanje transficiranih stanica U2OS (Kif18A-EGFP) s dodanom bojom SiR-tubulin korištene su pobudne laserske linije valnih duljina 488 nm i 640 nm. Snaga pobudnog lasera 488 nm je 20% za snimanje GFP, a snaga pobudnog lasera 640 nm je 10% za snimanje boje SiR-tubulin. Vrijeme pobuđivanja je 100 ms, a veličina točkaste konfokalne aperture (engl. *pinhole aperture*) je 45 μ m. Snimane su četiri središnje ravnine horizontalno postavljenog diobenog vretena, sa razmakom 0,5 μ m između ravnina. Vrijeme snimanja je svakih 20 sekundi.

2.4. Kvantitativno obrađivanje i analiziranje snimaka

Za kvantitativno obrađivanje i analiziranje mikroskopskih snimaka korišten je javno dostupni program ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, SAD) temeljen na programskom jeziku Java (Oracle Corporation, Redwood, SAD). Pozicije kinetohora u vremenu praćene su dostupnim modulom Low Light Tracking Tool (Krull i sur., 2014). Praćene su kinetohore u xy-ravnini na snimkama pojedinačnih z-ravnina ili do dvije z-projeksije maksimalnog intenziteta. Pozicije polova diobenog vretena u vremenu praćene su alatom više-točaka (engl. *multi-point tool*) (Slika 16).

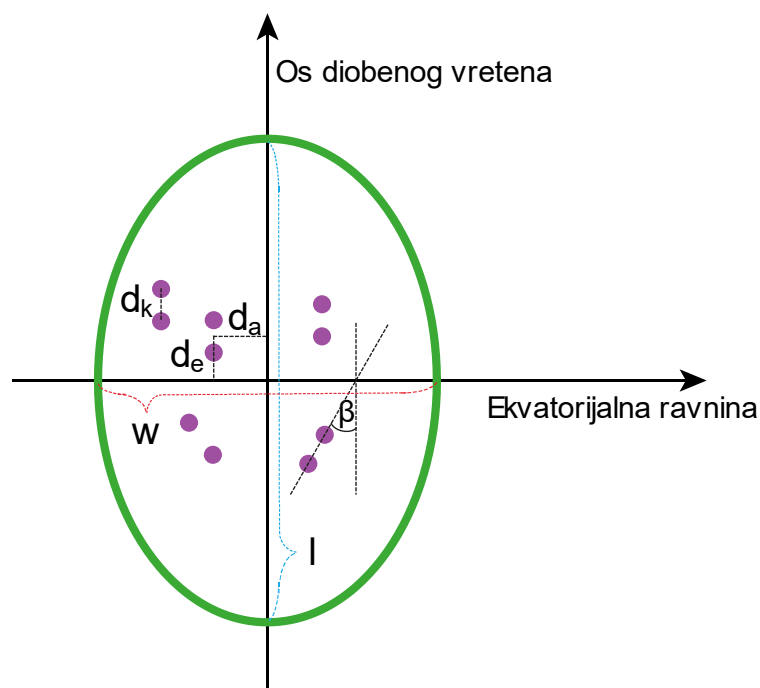


Slika 16. **Praćenje pozicije kinetohora u vremenu.** Pozicije kinetohora praćene su dostupnim modulom Low Light Tracking Tool u programu ImageJ. Sestrinske kinetohore označene su žutim i plavim kružićem, a pozicije polova bijelim križićem.

Kvantitativna i statistička analiza podataka izvršena je u programu MatLab R2015a (MathWorks, Natick, USA). U programu MatLab sve točke pozicije kinetohora u vremenu translirane su tako da je središte diobenog vretena u ishodištu (0,0) koordinatnog sustava i točke polova diobenog vretena leže na y-osi. Os diobenog vretena je linija koja prolazi kroz polove diobenog vretena. Ekvatorijalna ravnina definirana je kao okomita linija na os diobenog vretena u točki polovine duljine između dva pola vretena. Analizirani parametri popisani su u tablici 1. te su prikazani shematski na slici 17.

Tablica 1. **Popis mjerenih parametara.**

d_k	Međukinetohorna udaljenost
d_a	Udaljenost od međukinetohorne točke do osi diobenog vretena
d_e	Udaljenost od međukinetohorne točke do ekvatorijalne ravnine
β	Kut između pravca koji prolazi kroz kinetohore i okomice na ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena
l	Duljina diobenog vretena
w	Širina diobenog vretena

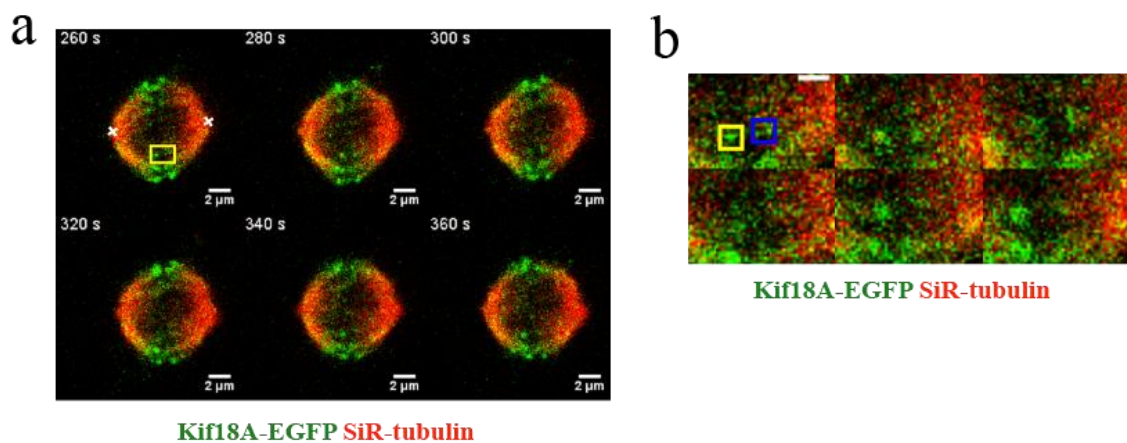


Slika 17. **Shematski prikaz mjerenih parametara.** Zelenom bojom označeno je diobeno vreteno. Ljubičasti krugovi su parovi kinetohora.

Pozicije sestrinskog para kinetohora praćene su 600 sekundi do trenutka započinjanja anafaze. U rezultatima su uključeni oni sestrinski parovi koji se prate dulje od dvije i pol minute te je zabilježeno vrijeme ulaska u anafazu. To je minimalni period u kojem se očekuje jedan period oscilacije kinetohornog para. Stumpff i suradnici (2008) na stanicama HeLa pokazali su kako se promjena smjera kretanja kinetohore događa svakih $1,58 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$. Nadalje, kinetohorni parovi su podijeljeni na vanjske i unutarnje pomoću parametra d_a . Parametar d_a označava udaljenost od osi diobenog vretena. Oni kinetohorni parovi koji su se više vremena kretali dalje od polovice poluširine diobenog

vretena definirani su kao vanjski, a oni parovi koji su bliže definirani su kao unutarnji. Duljina diobenog vretena mjerena je od jednog do drugog pola, dok je širina diobenog vretena mjerena između vanjskih kinetohora i okomito na os diobenog vretena.

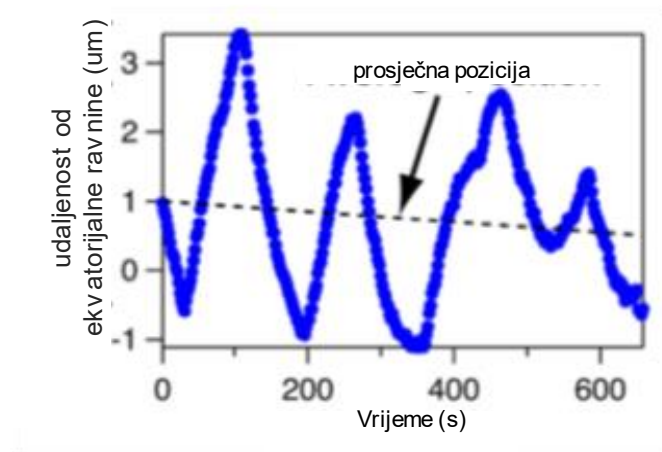
Intenzitet kinezina-8 u vremenu praćen je alatom pravokutnika (engl. *rectangle*) postavljanjem kvadrata u xy-ravnini veličine 4x4 piksela. Intenzitet kinezina-8 mjenen je u maloj regiji na mjestu akumulacije kinezina-8 na vrhu kinetohornog vlakna (Slika 18).



Također, dobiveni su grafički prikazi u programu MatLab. Za grafički prikaz slike 27. korištena je aplikacija prikazivanja krivulje (engl. *curve fitting*) u programu MatLab metodom linearne interpolacije podataka. Ostali dobiveni grafički prikazi povezani su u programu Adobe Illustrator CC 2017 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

2.5. Parametar DAP

Parametar DAP (devijacija kinetohorne prosječne pozicije engl. *deviation of a kinetochore from its average position*) predstavlja standardnu devijaciju svih udaljenosti od kinetohore do njene prosječne pozicije u vremenu. Pokazatelj je stupnja oscilacije kinetohora. Predstavlja opći parametar koji opisuje promjene u kinetohornoj brzini i promjeni smjera nepravilnih kretanja kinetohora (Slika 19) (Bissonette i Stumpff, 2014).

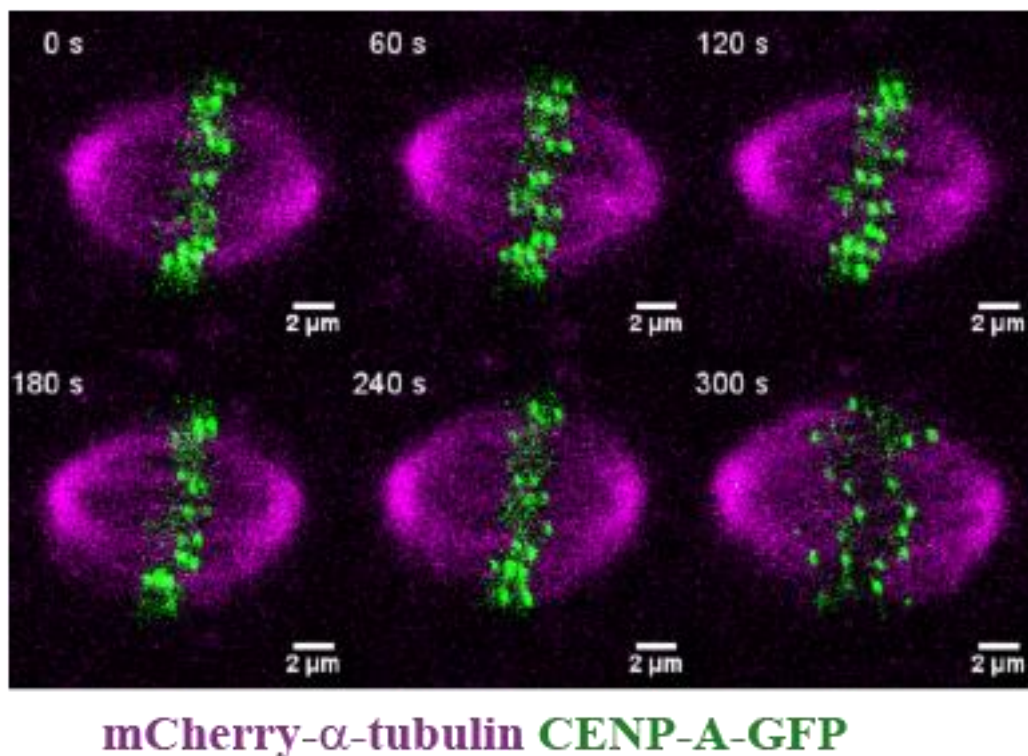


Slika 19. **Shematski prikaz mjerenja parametra DAP.** Parametar DAP predstavlja standardnu devijaciju udaljenosti između kinetohore (plave točke) i njene prosječne pozicije (isprekidana crna linija) u svakom vremenu. Predstavlja stupanj kromosomskog poravnanja u pojedinoj stanici.

3. REZULTATI

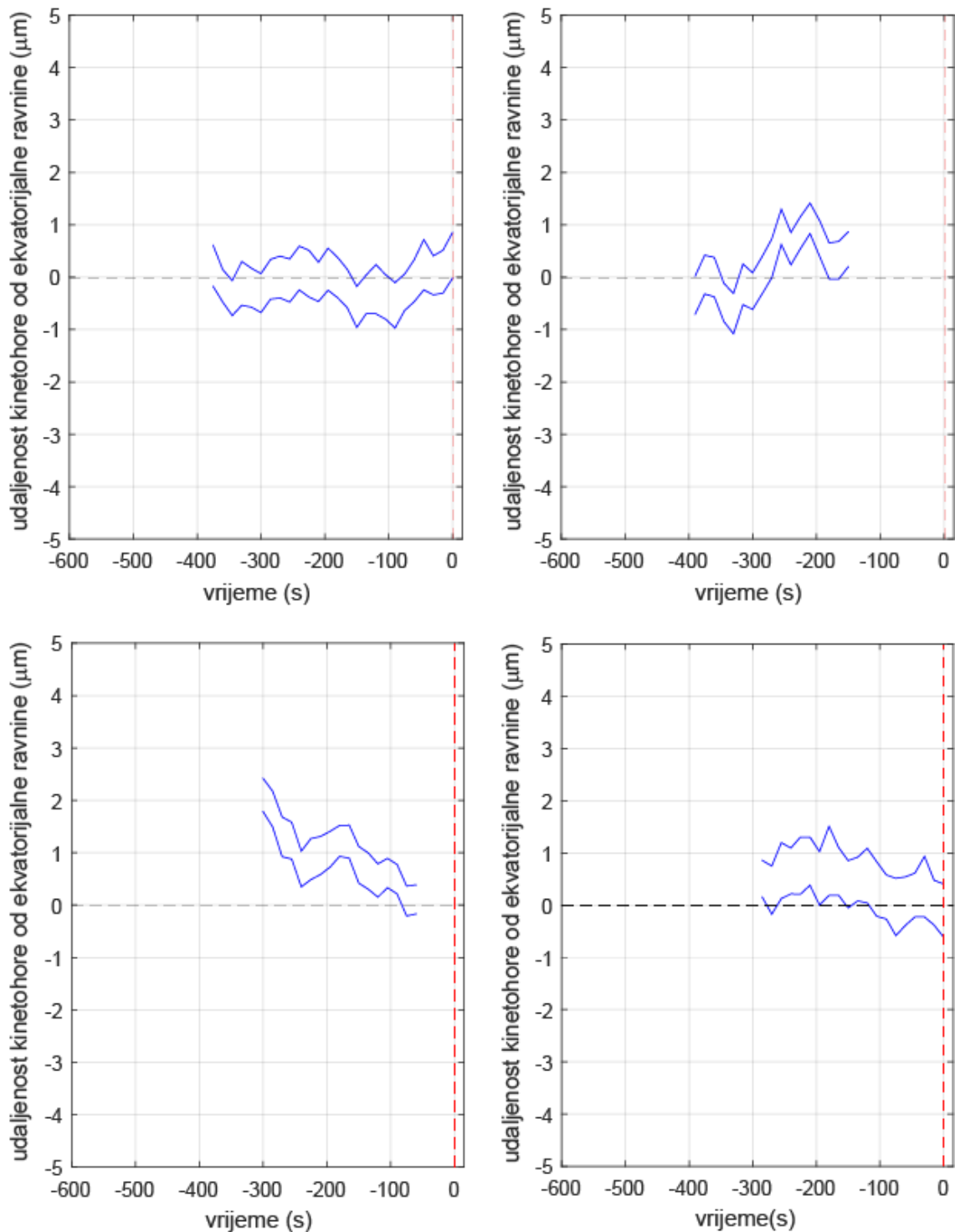
3.1. Sestrinske kinetohore dinamički se kreću u oscilatornom obrascu prema ekvatorijalnoj ravnini u metafazi

Tijekom metafaze, sestrinske kinetohore dinamički se kreću u oscilatornom obrascu. Jedna kinetohora se kreće u smjeru prema bližem polu, dok je druga prati sve dok ne dođe do promjene smjera kretanja. Sve sestrinske kinetohore imaju tendenciju kretanja prema ekvatorijalnoj ravnini sve do poravnanja sestrinskih kinetohora u ekvatorijalnoj ravnini prije anafaze (Slike 20, 21).



Slika 20. **Pozicija kinetohora u diobenom vretenu u metafazi i ulazak stanice u anafazu.** Pozicije kinetohora (zeleno) u diobenom vretenu (ljubičasto) stanične linije U2OS. (0 s) Stanica u metafazi. (60 s, 120 s, 180 s) Raspršenost kinetohora u ekvatorijalnoj ravnini i tendenciju poravnanja prije anafaze. (240 s) Nakon što se sestrinske kinetohore poravnaju u ekvatorijalnoj ravnini, započinje anafaza. (300 s) Stanica je ušla u anafazu i dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida.

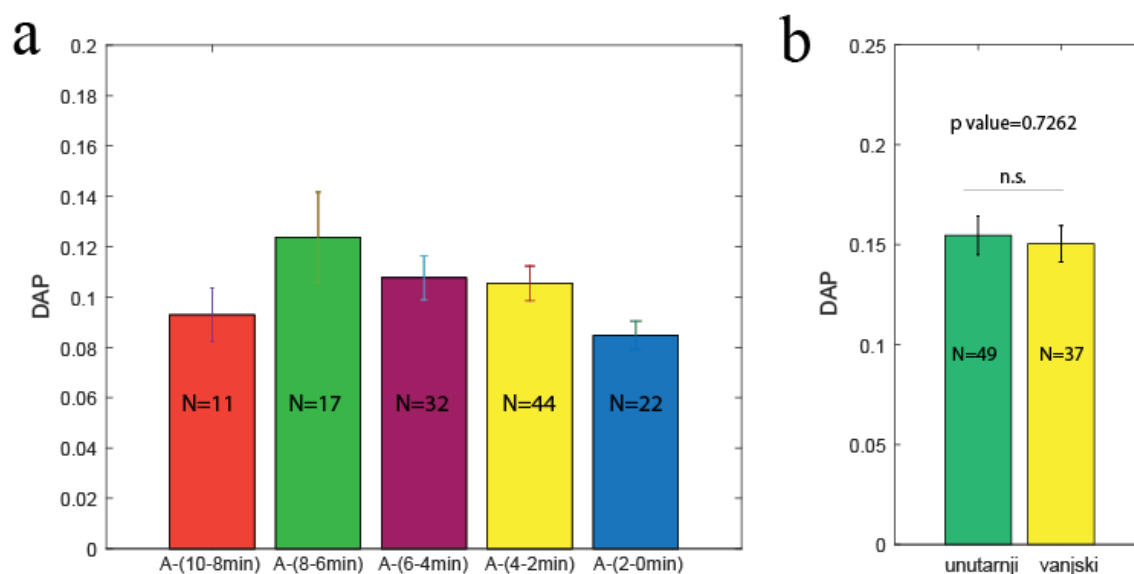
Analizirana je 31 stanica U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) i praćene su pozicije 86 sestrijskih kinetohora. Srednja vrijednost duljine diobenog vretena sa standardnom pogreškom iznosi $13,5 \pm 0,043 \mu\text{m}$ (N(stanica)=31, N(broj događaja)=947), dok srednja vrijednost širine diobenog vretena sa standardnom pogreškom iznosi $9,83 \pm 0,030 \mu\text{m}$ (N(stanica)=31, N(broj događaja)=947). Srednja vrijednost omjera duljine i širine diobenog vretena iznosi $1,38 \pm 0,0050$ (N(stanica)=31, N(broj događaja)=947).



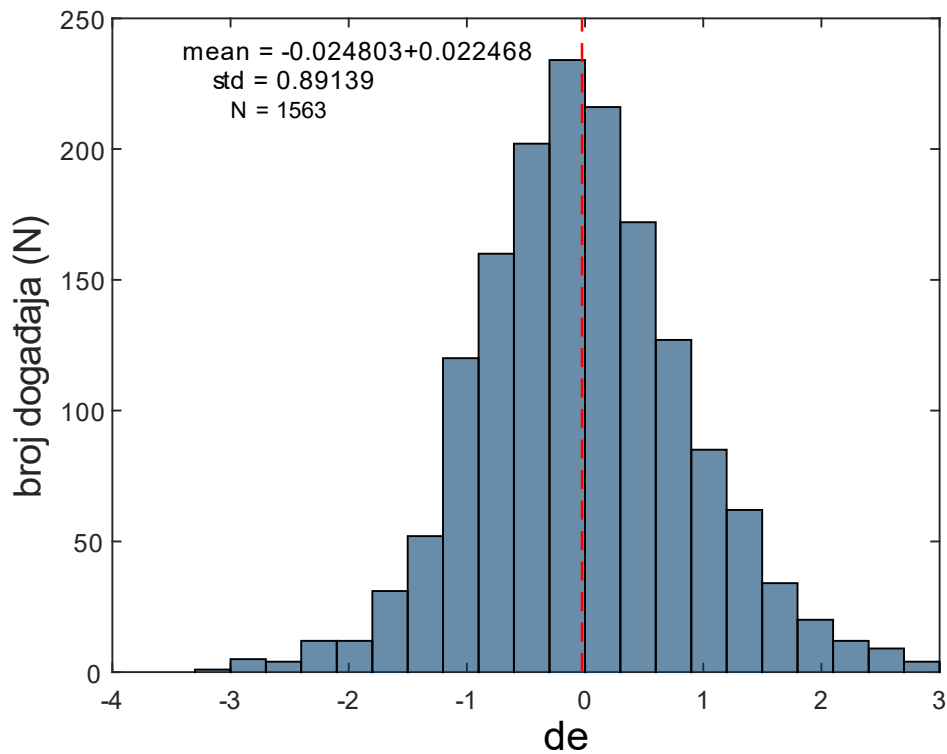
Slika 21. Udaljenost kinetohore od ekvatorijalne ravnine u vremenu tijekom **metafaze**. Jedan par kinetohora (plavo) prikazan je odvojeno u pojedinačnoj stanici. Vrijeme snimanja je 15 sekundi. Vrijeme ulaska u anafazu (0 s) prikazano je isprekidanom crvenom linijom. Ekvatorijalna ravnina prikazana je isprekidanom crnom linijom.

3.2. Stupanj oscilacija smanjuje se pred anafazu

Kako bi se istražilo postoji li razlika u stupnju oscilacija kinetohora tijekom metafaze, metafaza je podijeljena u 5 intervala po dvije minute. Izračunat je parametar DAP za svaki par kinetohora. Zatim su izračunate srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom svih parametara DAP u intervalu. U intervalu od 10 do 8 minuta prije anafaze iznosi $0,097 \pm 0,01 \mu\text{m}$, od 8 do 6 minute prije anafaze iznosi $0,12 \pm 0,02 \mu\text{m}$, od 6 do 4 minute $0,11 \pm 0,009 \mu\text{m}$, od 4 do 2 minute iznosi $0,11 \pm 0,007 \mu\text{m}$, od 2 minute do anafaze iznosi $0,089 \pm 0,006 \mu\text{m}$. Postoji statistički značajna razlika između intervala od 8 do 6 minute (N=17 parova kinetohora) i intervala od 2 minute do anafaze (N=22 sestrinske kinetohore), p-vrijednost iznosi 0,028. Dok usporedbom ostalih intervala nije pokazana statistička značajna razlika. Srednja vrijednost parametra DAP za vanjske sestrinske kinetohore manja je u odnosu na unutarnje kinetohore. Za unutarnje iznosi $0,16 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (N=49 sestrinskih kinetohora), a za vanjske iznosi $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (N=37 sestrinska kinetohora). Nije utvrđena statistički značajna razlika između stupnja oscilacija vanjskih i unutarnjih kinetohora (Slika 22).

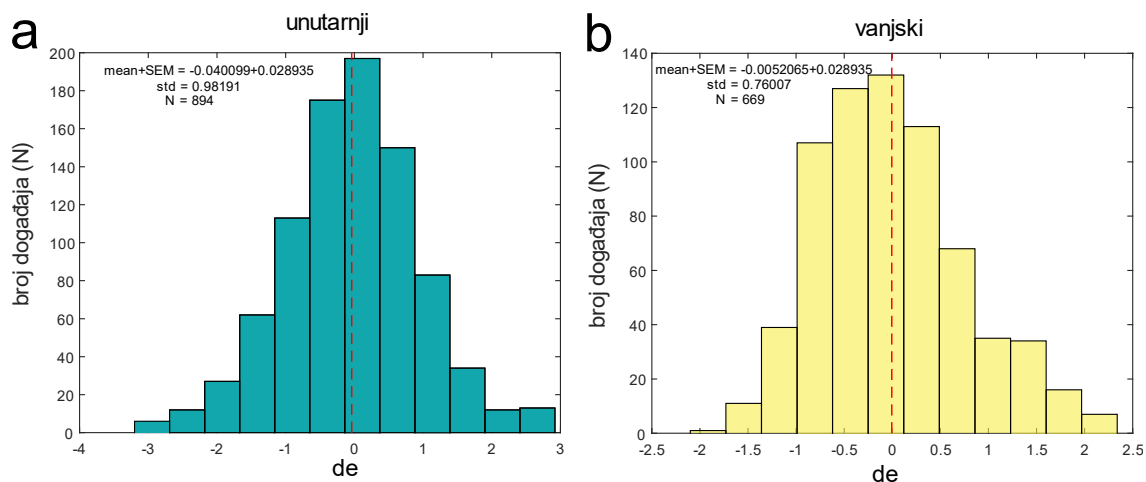


Slika 22. (a) Srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom parametra DAP u 5 intervala. Postoji statistički značajna razlika između intervala od 8 do 6 minuta i intervala od 2 minute do trenutka ulaska u anafazu i iznosi $p=0,028$ (b) Srednje vrijednosti parametra DAP sa standardnom pogreškom za unutarnje i vanjske sestrinske kinetohore. Nije pokazana statistički značajna razlika između stupnja oscilacija vanjskih i unutarnjih sestrinskih kinetohora.



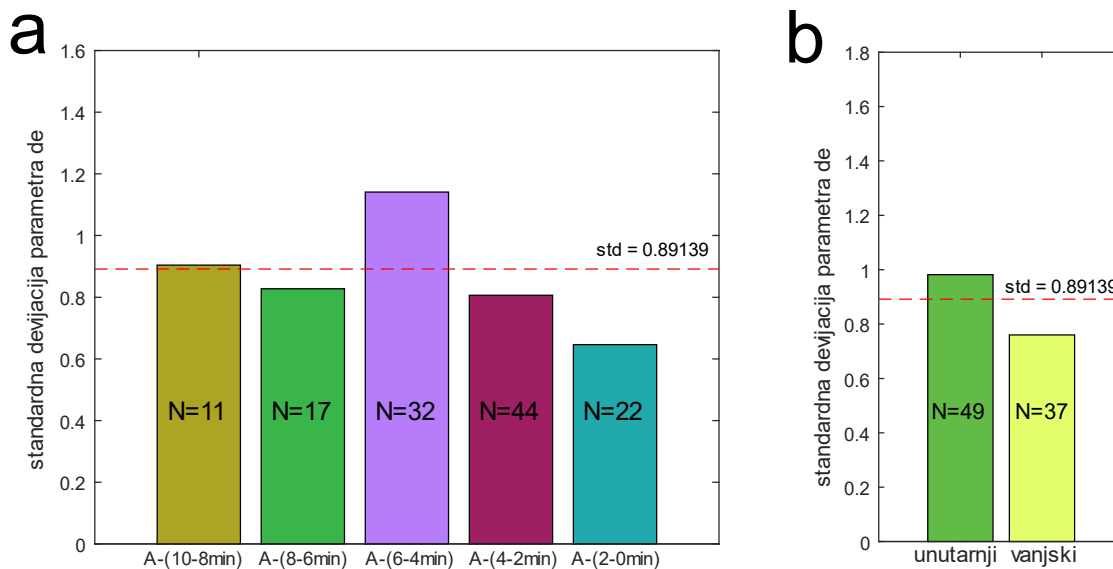
Slika 23. **Histogram parametra d_e za sve sestrinske kinetohore.** Prikazuje distribuciju svih sestrinskih kinetohora u odnosu na ekvatorijalnu ravninu. Crvenom isprekidanom linijom prikazana je srednja vrijednost. N (broj događaja) = 1563 d_e .

Sve kinetohore imaju tendenciju kretanja prema ekvatorijalnoj ravnini i poravnanja u ekvatorijalnoj ravnini pred anafazu. Srednja vrijednost svih prosječnih udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine sa standardnom pogreškom iznosi $-0,025 \pm 0,02 \mu\text{m}$, a standardna devijacija svih prosječnih udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine iznosi $0,89 \mu\text{m}$ (Slika 23). Srednja vrijednost prosječnih udaljenosti unutarnjih kinetohora od ekvatorijalne ravnine sa standardnom pogreškom iznosi $0,040 \pm 0,03 \mu\text{m}$ (Slika 24a), dok srednja vrijednost vanjskih kinetohora sa standardnom pogreškom iznosi $-0,0052 \pm 0,03 \mu\text{m}$ (Slika 24b).



Slika 24. (a) **Histogram parametra d_e za unutarnje sestrinske kinetohore.** Prikazuje raspodjelu unutarnjih sestrinskih kinetohora u odnosu na ekvatorijalnu ravninu. Crvenom isprekidanom linijom prikazana je srednja vrijednost. N (broj događaja)= 894 d_e . (b) **Histogram parametra d_e za vanjske sestrinske kinetohore.** Prikazuje raspodjelu vanjskih sestrinskih kinetohora u odnosu na ekvatorijalnu ravninu. Crvenom isprekidanom linijom prikazana je srednja vrijednost. N (broj događaja)= 669 d_e .

Kako su oscilatorna kretanja sestrinskih kinetohora nepravilna i sve sestrinske kinetohore imaju tendenciju kretanja prema ekvatorijalnoj ravnini, za opisivanje stupnja oscilacija izračunata je standardna devijacija svih prosječnih udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijane ravnine u 5 intervala od 2 minute. Dobivene vrijednosti uspoređene su sa ukupnom standardnom devijacijom svih praćenih sestrinskih kinetohora. Standardna devijacija prosječne udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine u intervalu od 6 do 4 minute prije anafaze veća je od ukupne standardne devijacije svih praćenih kinetohora (Slika 25a).

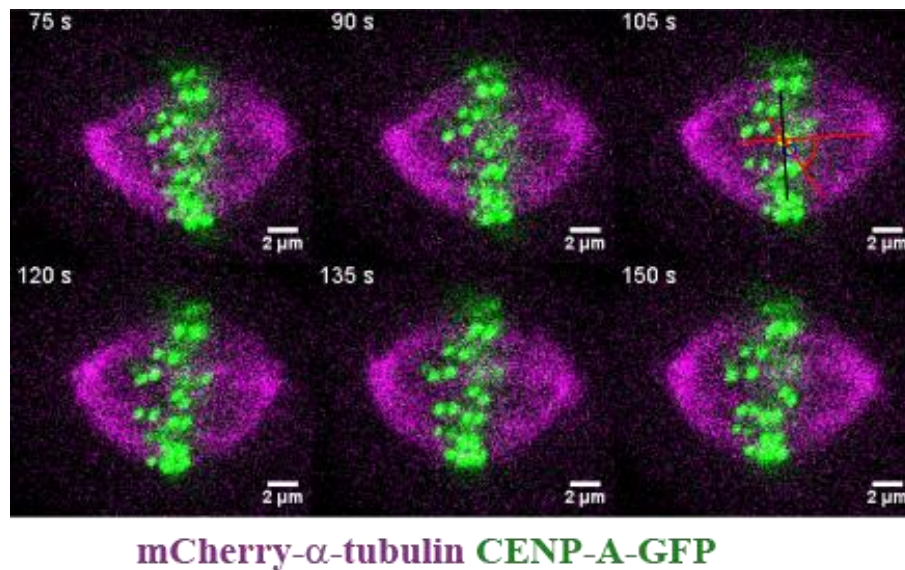


Slika 25. (a) **Standardna devijacija parametra d_e u 5 intervala.** Standardna devijacija svih prosječnih udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine u 5 intervala. (b) **Standardna devijacija parametra d_e za vanjske i unutarnje sestrinske kinetohore.** Crvenom isprekidanom linijom prikazana je standardna devijacija svih sestrinskih kinetohora.

Standardna devijacija prosječne udaljenosti unutarnjih kinetohora od ekvatorijalne ravnine veća je od ukupne standardne devijacije svih praćenih kinetohora, dok je standardna devijacija vanjskih kinetohora manja od ukupne (Slika 25b).

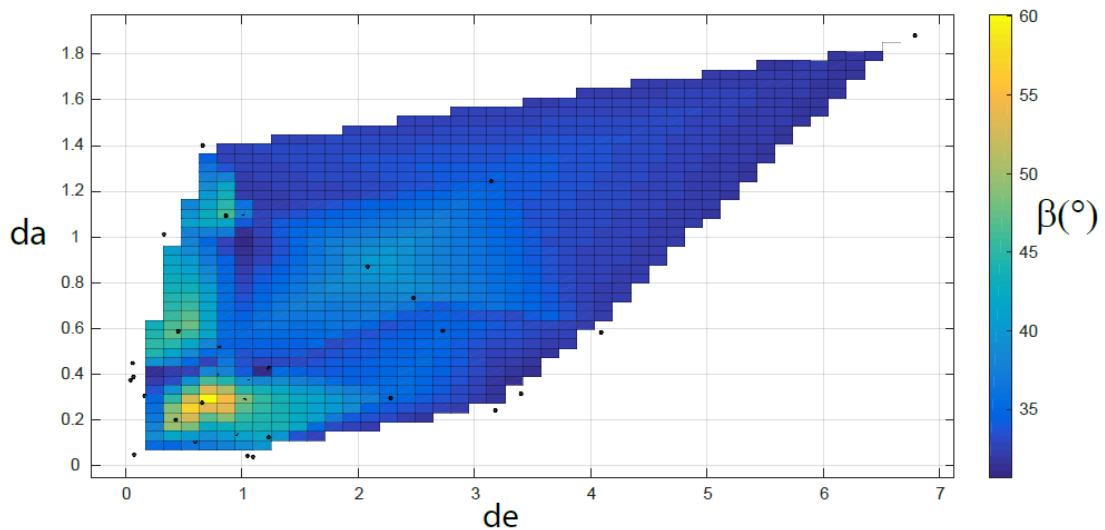
3.3. Negativna korelacija međukinetohorne udaljenosti i kuta β

Tijekom kinetohornih kretanja mjeren je kut između pravca koji prolazi kroz kinetohore i okomice na ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena nazvan kut β . Zabilježena je pojava kuta β većeg od 30° (Slika 26). Uzimajući u obzir mjerenje kuta u svakom vremenu, postotak pojave kuta β većeg od 30° iznosi 2,3%. Srednja vrijednost kuta β sa standardnom pogreškom iznosi $10,8 \pm 0,21^\circ$. Za unutarnje kinetohore iznosi $11,6 \pm 0,31^\circ$, dok za vanjske iznosi $9,82 \pm 0,27^\circ$.



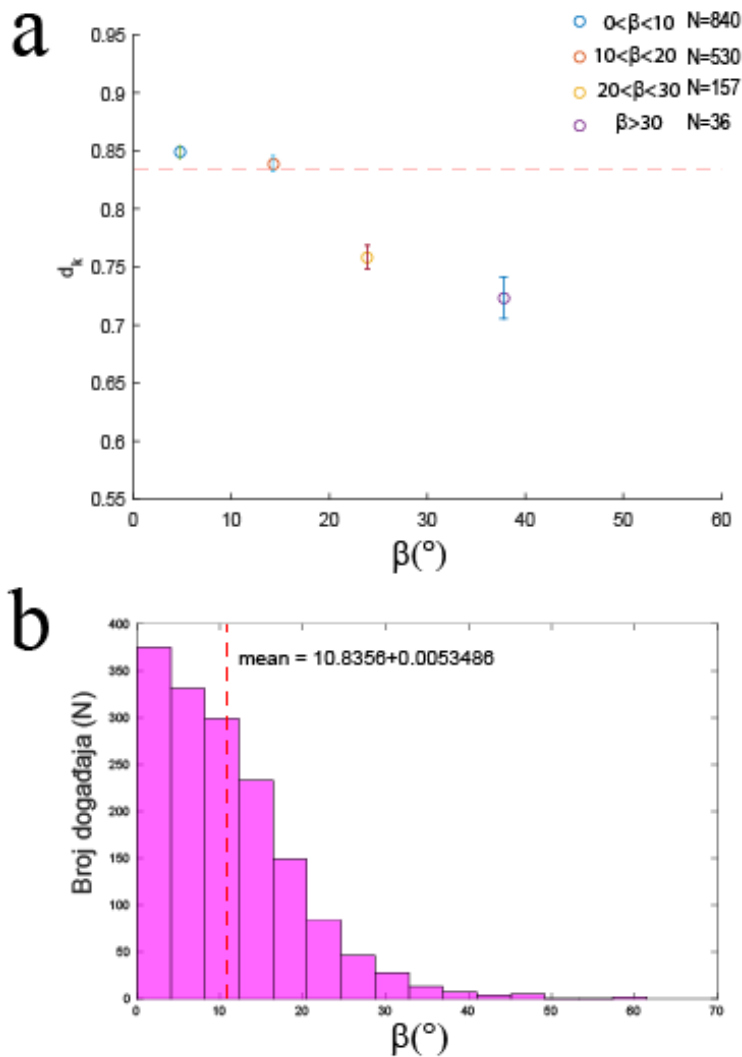
Slika 26. **Prikaz pojave velikog kuta β .** Unutarnji kinetohorni par prikazan je žutim i plavim kružićem prikazan na slici u vremenu (105 s). Crnom linijom je prikazana ekvatorijalna ravnina, crveno je prikazan nastali kut tijekom kretanja sestrinskih kinetohora.

Kako bi se istražilo u kojem dijelu diobenog vretena se pojavljuju kutevi β veći od 30° u odnosu na ekvatorijalnu ravninu i os diobenog vretena, izdvojeni su i prikazani veći kutevi na 3D grafičkom prikazu slike 27. Pokazano je kako se veći kutevi pojavljuju bliže osi diobenog vretena i bliže ekvatorijalnoj ravnini, odnosno blizu središta diobenog vretena.



Slika 27. **Grafički 3D prikaz pojave većih β kuteva u diobenom vretenu.** Parametri d_a i d_e su u apsolutnoj vrijednosti te je na taj način prikazana četvrtina diobenog vretena. Legenda gradijentno prikazuje stupnjeve kuta β u odnosu na parametre d_e i d_a . Žute i svijetlo plave regije pokazuje pojavu većih kuteva.

Srednja vrijednost svih međukinetohornih udaljenosti sa standardnom pogreškom iznosi $0,84 \pm 0,004 \mu\text{m}$. Za unutarnje sestrinske kinetohore iznosi $0,85 \pm 0,005 \mu\text{m}$, dok za vanjske iznosi $0,82 \pm 0,006 \mu\text{m}$. Kako bi se utvrdio odnos kuta β i međukinetohorne udaljenosti, kutevi su podijeljeni u intervale od 0° do 10° , od 10° do 20° , od 20° do 30° i veći od 30° . Na slici 28a prikazan je odnos srednjih vrijednosti međukinetohorne udaljenosti i srednjih vrijednosti kuta β za pojedine intervale. Postoji negativna korelacija kuta β i međukinetohorne udaljenosti. Prikazana je raspodjela svih kuteva β sa srednjom vrijednošću na slici 28b.



Slika 28. (a) **Odnos srednjih vrijednosti kuta β i srednjih vrijednosti međukinetohorne udaljenosti u četiri prikazana intervala.** Što je veći kut β to je manja međukinetohorna udaljenost, i obrnuto. Crvenom isprekidanom linijom prikazana je srednja vrijednost svih međukinetohornih udaljenosti. (b) **Histogram kuta β .** Prikazana je srednja vrijednost kuta β crvenom isprekidanom linijom.

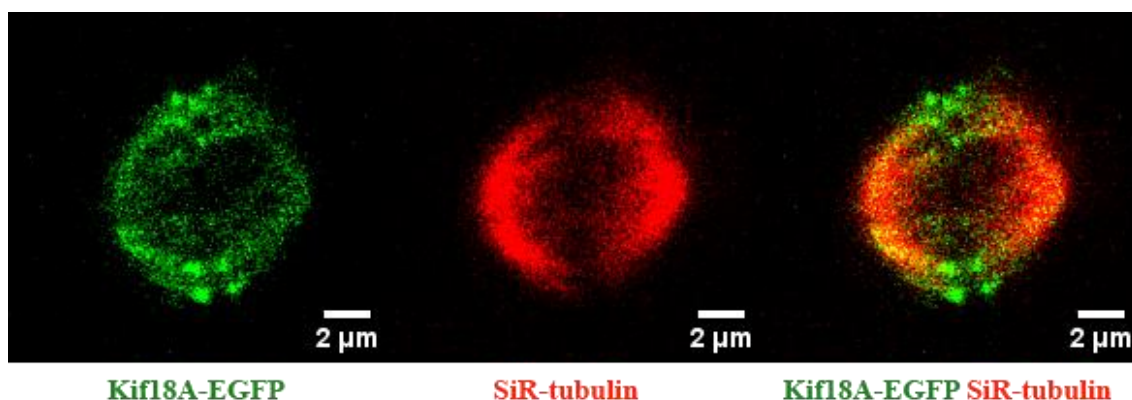
Srednje vrijednosti analiziranih parametara sa standardnom pogreškom mogu se usporediti u tablici 2.

Tablica 2. **Prikaz srednjih vrijednosti analiziranih parametara sa standardnom pogreškom.**

Praćeni parametar	Srednja vrijednost ± SEM	Praćeni parametar	Srednja vrijednost ± SEM
Duljina diobenog vretena (μm) N(stanica)=31 N(događaja)=947	13,5 ± 0,043	β kut (°) N(broj stanica)=31 N(kc parova)=86	10,8 ± 0,21
Širina diobenog vretena (μm) N(stanica)=31 N(događaja)=947	9,83 ± 0,030	β kut (°) unutarnji parovi N(kc parova)=50 N(događaja)=894	11,6 ± 0,31
Omjer duljine i širine diobenog vretena (l/w) N(stanica)=31 N(događaja)=947	1,38 ± 0,0050	β kut (°) vanjski parovi N(kc parova)=36 N(događaja)=669	9,82 ± 0,27
d _k (μm) N(stanica)=31 N(kc parova)=86	0,84 ± 0,004	DAP N(kc parova)=66	0,14 ± 0,006
d _k unutarnji (μm) N(kc parova)=50 N(događaja)=894	0,85 ± 0,005	DAP unutarnji N(kc parova)=49	0,16 ± 0,01
d _k vanjski (μm) N(kc parova)=36 N(događaja)=669	0,82 ± 0,006	DAP vanjski N(kc parova)=37	0,15 ± 0,01

3.4. Kinezin-8 se akumulira u gradijentnom obrascu poput komete na kinetohornim vlaknima

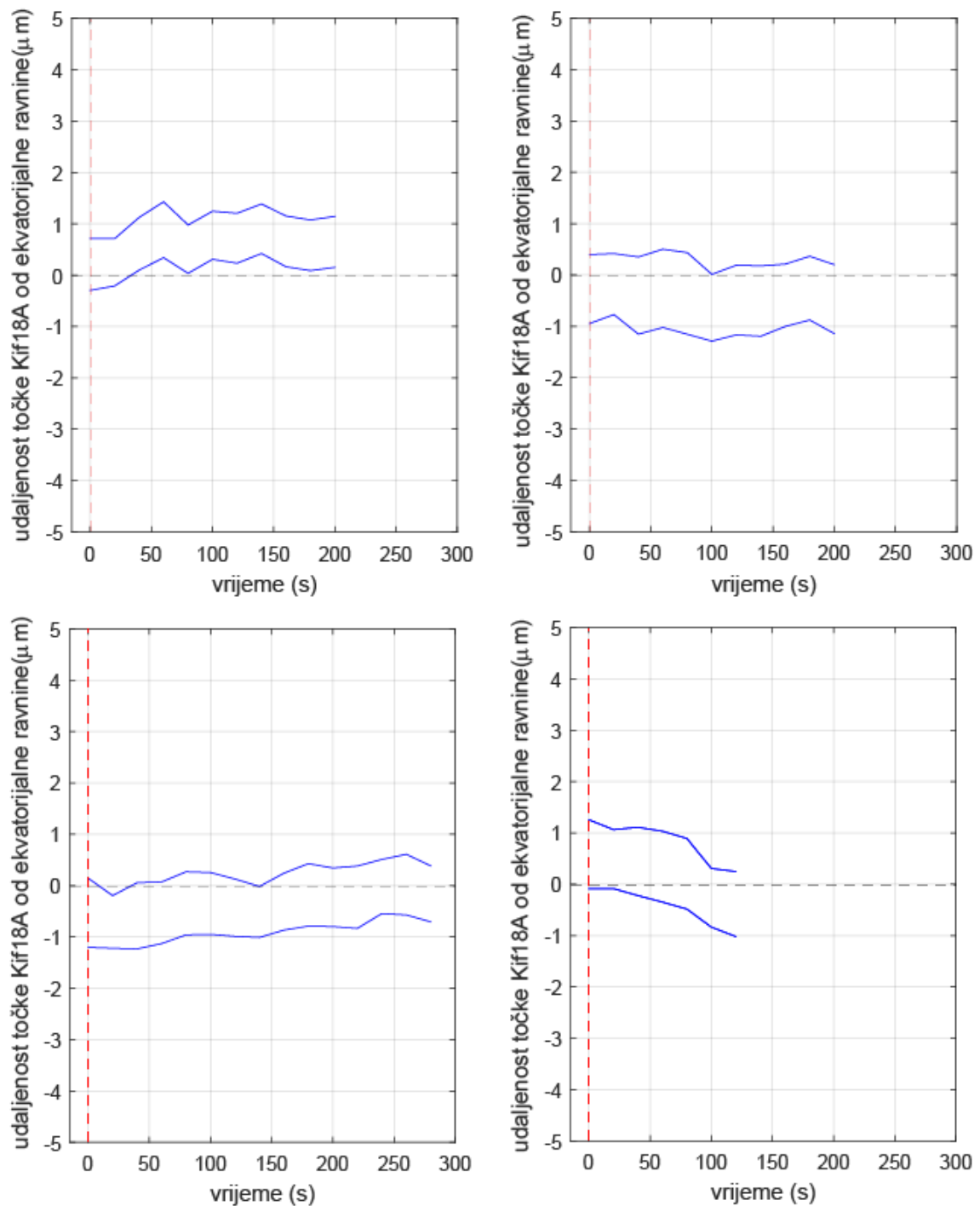
Rezultati su pokazali kako se motorni proteini kinezini-8 akumuliraju u gradijentu obrasca poput komete po duljini mikrotubula s akumulacijom na vrhu kinetohornog vlakna. Tijekom metafaze kada su kinetohore blizu ekvatorijalne ravnine, Kif18A je raspoređen u obrascu poput komete na svim kinetohorima. Zabilježena je veća akumulacija kinezina-8 na perifernim kinetohornim vlaknima u odnosu na unutarnje, bliže osi diobenog vretena (Slika 29).



Slika 29. Divlji tip stanične linije U2OS transficiran plazmidnom DNA Kif18A-EGFP s dodanom fluorogeničnom bojom SiR-tubulin. Kinezin-8 se akumulira u gradijentnom obrascu poput komete na svim kinetohornim vlaknima, s većom akumulacijom na perifernim kinetohornim vlaknima. Prikazana je jedna središnja z-ravnina.

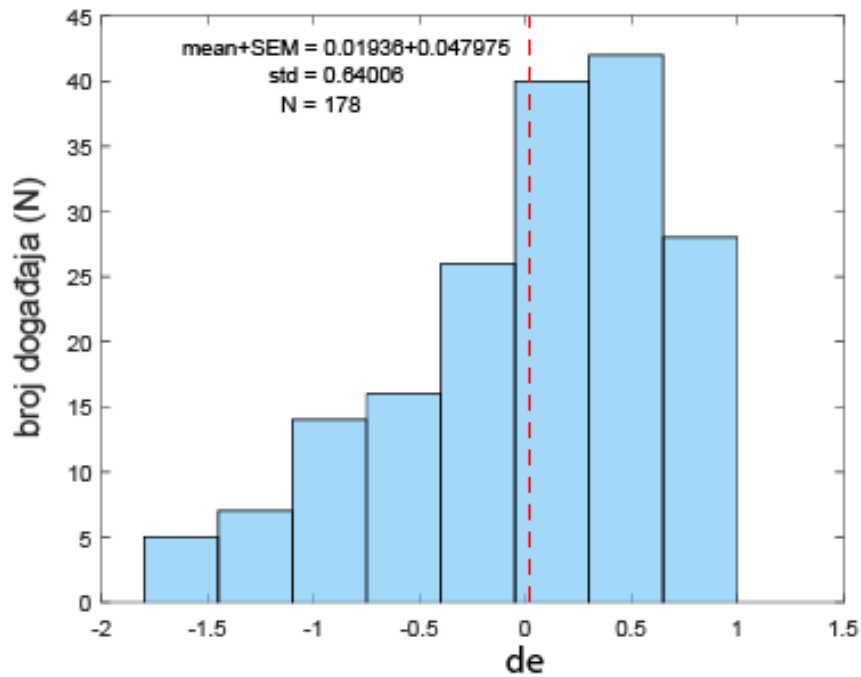
3.5. Prolazna ekspresija smanjuje stupanj oscilacija i smanjuje duljinu diobenog vretena stanica U2OS

Udaljenost točke kinezina-8 (Kif18A) od ekvatorijalne ravnine i promjena intenziteta kinezina-8 analizirana je na 21 sestrinskoj kinetohori u 16 stanica. Točka kinezina-8 definirana je kao mjesto akumulacije kinezina-8 na vrhu kinetohornog vlakna. Zabilježen je manji stupanj oscilacija točke kinezina-8 kod stanica U2OS (Kif18A-EGFP; SiR-tubulin) u odnosu na stanice U2OS (mCherry- α -tubulin; CENP-A-GFP) (Slika 21, 30).



Slika 30. **Udaljenost točke kinezina-8 (Kif18A) od ekvatorijalne ravnine u metafazi.** Dvije sestrinske točke kinezina-8 (plavo) prikazane su odvojeno u pojedinačnoj stanici. Ekvatorijalna ravnina prikazana je crnom isprekidanom linijom. Crvenom isprekidanom linijom označeno je vrijeme započinjanja praćenja pozicije točke kinezina-8. Vrijeme snimanja je 20 sekundi.

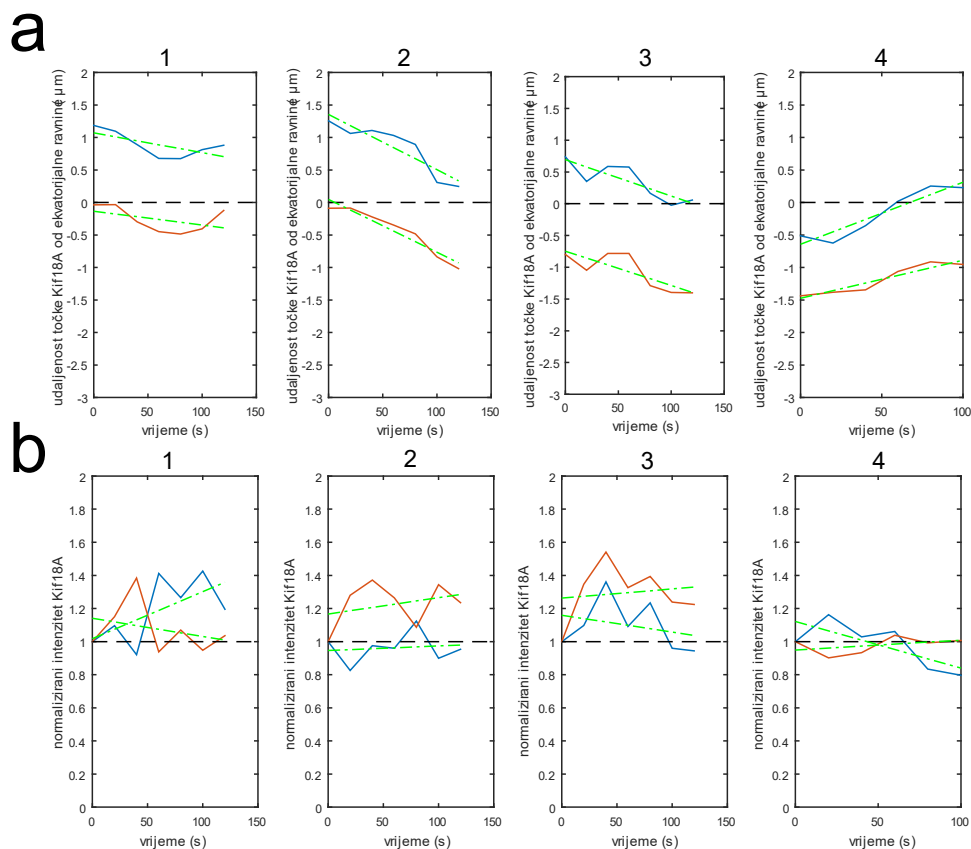
Izračunat je i parametar d_e za točke kinezina-8. Točke kinezina-8 imaju tendenciju kretanja prema ekvatorijalnoj ravnini (Slika 31).



Slika 31. **Histogram parametra d_e stanica U2OS (Kif18A-EGFP; SiR-tubulin).** Crvenom isprekidanom linijom prikazana je srednja vrijednost.

Izračunata srednja vrijednost kuta β točaka kinezina-8 sa standardnom pogreškom kod stanica U2OS (Kif18A-EGFP; SiR-tubulin) iznosi $8,96 \pm 0,54^\circ$, srednja vrijednost udaljenosti između točaka kinezina-8 sa standardnom pogreškom iznosi $1,2 \pm 0,01 \mu\text{m}$ i duljine diobenog vretena iznosi $9,28 \pm 0,061 \mu\text{m}$.

Mjerenjem intenziteta kinezina-8 u vremenu, u većini analiziranih stanica intenzitet zadržava konstantnu vrijednost (Slika 32). Prolazna ekspresija utjecala je na oscilacije sestrinskih kinetohora.



Slika 32. (a) **Udaljenost pozicije akumulacije kinezina-8 na kinetohori od ekvatorijalne ravnine u vremenu.** Izdvojeni su parovi koji imaju koordinirano usmjereno kretanje prema jednom polu. Zelenom isprekidanom linijom označena je linearna regresija udaljenosti pridruženoj sestrinskoj kinetohori. (b) **Promjena normaliziranog intenziteta kinezina-8 na kinetohornom vlaknu u vremenu.** Zelenom isprekidanom linijom označena je linearna regresija normaliziranog intenziteta kinezina-8 u vremenu pridruženoj sestrinskoj kinetohori. Na slici (a) istom bojom je označena pozicija sestrinske kinetohore i pridružen joj intenzitet na slici (b) pod istim rednim brojem.

4. RASPRAVA

Metafazni kromosomi u stanicama U2OS osciliraju oko ekvatorijalne ravnine sve do poravnanja u ekvatorijalnoj ravnini prije anafaze. U kontrolnoj grupi HeLa stanica parametar DAP iznosi $0,46 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ($n=104$, vrijeme snimanja=5s) (Stumpff i sur., 2008) i $0,21 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ($n=30$, vrijeme snimanja=5s) (Stumpff i sur., 2011). Usporedbom dobivenih rezultata s dosadašnjim istraživanjima, postoji razlika u vrijednostima parametra DAP. Uzrok tomu može biti nemogućnost praćenja velikog broja sestrinskih kinetohora zbog učestalog preklapanja kinetohora u putanji tijekom analize snimki.

Oscilatorna kretanja sestrinskih kinetohora imaju nepravilan period i amplitudu oscilacije. Također, brzina kretanja s relativno konstantnim periodom oscilacije se smanjuje prema anafazi (Jaqaman i sur., 2010). Uzimajući sve to u obzir zajedno s nemogućnošću praćenja pozicije sestrinskih kinetohora u duljem vremenskom razdoblju zbog preklapanja u putanji, parametar DAP koji koristi linearnu regresiju nije pogodan za definiranje stupnja oscilacija. Kako sestrinske kinetohore imaju tendenciju kretanja prema ekvatorijalnoj ravnini, što pokazuje srednja vrijednost ukupnog parametra d_e za sve sestrinske kinetohore koja iznosi $-0,025 \pm 0,02 \mu\text{m}$, kao pokazatelj stupnja oscilatornih kretanja izmjerena je standardna devijacija prosječnih udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine koja iznosi $0,89 \mu\text{m}$.

Parametar DAP pogodan je kod pravilnih oscilatornih kretanja te ako je u vremenskom razdoblju praćen puni period oscilacije. Također, pogodan je prilikom usporedbe stupnja oscilacija kontrolne grupe stanica i stanica s pojačanom ili utišanom ekspresijom proteina. Standardna devijacija prosječne udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine bolji je pokazatelj ukupnog stupnja oscilacija kod oscilacija s nepravilnim periodom i amplitudom. Ovaj način pogodan je za veći broj praćenih sestrinskih kinetohora.

Dobiveni rezultati standardne devijacije prosječne udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine postoji razlika u oscilacijama u pojedinim intervalima u metafazi. Veći je stupanj oscilacija sestrinskih kinetohora u intervalu od 6 do 4 minute prije anafaze u odnosu na interval 2 minute pred anafazu. Standardna devijacija prosječne udaljenosti unutarnjih kinetohora od ekvatorijalne ravnine veća je od ukupne standardne devijacije svih praćenih kinetohora, dok je standardna devijacija vanjskih kinetohora manja od ukupne.

Srednja vrijednost duljine diobenog vretena kod stanica U2OS (mCherry- α -tubulin; CENP-A-GFP) sa standardnom pogreškom iznosi $13,5 \pm 0,043 \mu\text{m}$. Srednja vrijednost i standardna pogreška duljine diobenog vretena kod stanične linije HeLa iznosi $12,2 \pm 0,59 \mu\text{m}$ mjereno obilježavanjem centrina ($n=44$) (Stumpff i sur., 2008). U kontrolnim stanicama stanične linije Drosophila S2 duljina diobenog vretena iznosi $11,5 \pm 2,0 \mu\text{m}$ mjereno obilježavanjem centrosoma (Goshima i sur., 2005).

Dobivena srednja vrijednost međukinetohorne udaljenosti iznosi $0,84 \pm 0,004 \mu\text{m}$, dok srednja vrijednost međukinetohorne udaljenosti kod HeLa stanica koje ekprimiraju mRFP-CENP-B iznosi $0,78 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (Stumpff i sur., 2008).

Kut β veći od 30° pojavljuju se bliže osi diobenog vretena i bliže ekvatorijalnoj ravnini odnosno u blizini središta diobenog vretena. Dobivena je očekivano veća srednja vrijednost kuta β unutarnjih kinetohora u odnosu na vanjske kinetohore. Vanjske kinetohore su bliže konturi diobenog vretena te je na vanjskim kinetohorima prisutan kut zbog konveksnog oblika diobenog vretena.

Rezultati su pokazali kako postoji negativna korelacija međukinetohorne udaljenosti i kuta β . Burroughs i suradnici (2015) zabilježili su pojavu istog kuta između pravca koji prolazi kroz kinetohore i okomice na ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena. Zabilježena je pojava velikog kuta β nakon što vodeća sestrinska kinetohora potakne promjenu smjera (LIDS). Nakon što vodeća potakne promjenu smjera dolazi do smanjenja sile napetosti, te zajedno s time i smanjenja međukinetohorne udaljenosti.

Kinezin-8 ima sporu motornu aktivnost i utječe na sile napetosti prisutne između sestrinskih kinetohora. U skadu s utjecajem na sile napetosti, istraživanja su pokazala kako nedostatak kinezina-8 u stanici utječe na odgađanje ulaska stanica u anafazu preko kontrolne točke diobenog vretena (Mayr i sur., 2007; Zhu i sur., 2005). Stopa katastrofe ovisi o količini kinezina-8 koji se akumulira na plus-kraju mikrotubula. Dosadašnji rezultati istraživanja pokazali su kako kinezin-8 utječe na međukinetohornu udaljenost, a prema tome i na sile napetosti između sestrinskih kinetohora. Na taj način reguliraju kontrolnu točku diobenog vretena koja provjerava jesu li svi kromosomi povezani na mikrotubule diobenog vretena i jesu li sestrinske kromatide pravilno orijentirane prema suprotnim polovima diobenog vretena.

Standardna devijacija svih prosječnih udaljenosti sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine kod stanica U2OS (mCherry- α -tubulin; CENP-A-GFP) koja iznosi $0,89 \mu\text{m}$ i

standardna devijacija prosječne udaljenosti svih točaka kinezina-8 od ekvatorijalne ravnine kod stanica U2OS (Kif18A-EGFP; SiR-tubulin) iznosi 0,64 μm ukazuju kako je smanjen stupanj oscilacija kod stanica U2OS sa prolaznom ekspresijom.

Zabilježena je manja srednja vrijednost kuta β točke kinezina-8 kod stanica U2OS (Kif18A-EGFP; SiR-tubulin) s prolaznom ekspresijom kinezina-8 koja iznosi $8,96 \pm 0,54^\circ$, u odnosu na srednju vrijednost kuta β kod stanica U2OS (mCherry- α -tubulin; CENP-A-GFP) koja iznosi $10,8 \pm 0,21^\circ$. Prolazna ekspresija povećava međukinetohornu udaljenost te prisutnost velike sile napetosti između sestrinskih kinetohora ne dozvoljava nastanak većeg kuta β . Prolazna ekspresija utjecala je na duljinu diobenog vretena stanica U2OS. Kod stanica U2OS (mCherry- α -tubulin; CENP-A-GFP) duljina diobenog vretena iznosi $13,5 \pm 0,043 \mu\text{m}$, dok kod stanica U2OS (Kif18A-EGFP; SiR-tubulin) iznosi $9,28 \pm 0,061 \mu\text{m}$.

Dobiveni rezultati akumulacije kinezina-8 u gradijentnom obrascu poput komete na kinetohornom vlaknu u skladu su s dosadašnjim istraživanjima (Stumpff i sur., 2008; Stumpff i sur., 2011). Veća je akumulacija na kinetohornim vlaknima smještenim periferno u diobenom vretenu, koji su ujedno i dulji. Kinezin-8 ima visoko-procesivnu sporu motornu aktivnost te pri tome mora proću udaljenost koja je velika za proteine slične kinezinima (Vale i sur., 1996).

Rezultati mjenjenja intenziteta Kip3p (kinezin-8 kod pupajućeg kvasca *Saccharomyces cerevisiae*) pokazuju kako postoji specifična akumulacija kinezina-8 na kinetohornim vlaknima. Nadalje, postoji velika akumulacija Kip3p na plus kraju rastućih mikrotubula i manja akumulacija na plus kraju skraćujućih mikrotubula (Gupta i sur., 2006).

Na dobiveni odnos između udaljenosti točke kinezina-8 od ekvatorijalne ravnine i intenziteta kinezina-8 mogla je utjecati i prolazna ekspresija kinezina-8. Prisutnost endogenog kinezina-8 i obilježenog kinezina-8 sa plazmidne DNA mogla je utjecati na mehanizam oscilacija. Nadalje, kako kinezin-8 bolje depolimerizira dulja kinetohorna vlakna, na kraćima se ne akumulira te postoji polimerizacijski bias kada nema kinezina-8 na kinetohornom vlaknu (Armond i sur., 2015; VandenBeldt i sur., 2006). Istraživanje je pokazalo kako niti gotovo potpuno uklanjanje proteina Kif18A (preko 90%) ne uzrokuje potpuno nasumično kretanje kinetohora što vodi do zaključka kako postoji još komponenti koji utječu na oscilatorni obrazac kretanja (Stumpff i sur., 2008). Obilježavanje kinetohornog i centromernog markera istom fluorescentnom bojom omogućilo bi brže snimanje s manjim utjecajem lasera na žive stanice. Veća vremenska

rezolucija pridonjela bi mjerenju brzine i promjene smjera kretanja kinetohore te bi tako pridonjela boljem razumjevanju aktivnosti kinezina-8.

5. ZAKLJUČAK

Kod stanične linije U2OS u metafazi mitoze sestrinske kinetohore se dinamički kreću prema ekvatorijalnoj ravnini sve do poravnanja kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini pred anafazu. Stupanj oscilacija sestrinskih kinetohora u intervalu od 6 do 4 minute prije anafaze je veći u odnosu na stupanj oscilacija u intervalu 2 minute prije anafaze. Unutarnje sestrinske kinetohore imaju veći stupanj oscilacija od vanjskih sestrinskih kinetohora. Kut β je kut između pravca koji prolazi kroz kinetohore i okomice na ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena. Kut β veći od 30° pojavljuje se kod unutarnjih sestrinskih kinetohora, bliže osi diobenog vretena i bliže ekvatorijalnoj ravnini. Zabilježena je negativna korelacija međukinetohorne udaljenosti i kuta β . Što je veći kut β , međukinetohorna udaljenost je manja, i obrnuto. Manja međukinetohorna udaljenost ukazuje na smanjenje sile napetosti između sestrinskih kinetohora, ujedno kada se pojavljuje i veći kut β .

Kinezin-8 akumulira se u gradijentnom obrascu poput komete na svim kinetohornim vlaknima, s većom akumulacijom na perifernim vlaknima u odnosu na kinetohorna vlakna bliže osi diobenog vretena. Prolazna ekspresija smanjuje stupanj oscilacija točaka kinezina-8 i smanjuje duljinu diobenog vretena.

Daljnjim istraživanjem potrebno je provjeriti povezanost skraćivanja kinetohornog vlakna depolimerizacijom pomoću kinezina-8, koja povećava sile napetosti između sestrinskih kinetohora, i premošćujućih vlakana koji uravnotežuju prisutne sile u diobenom vretenu.

6. LITERATURA

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007): Molecular biology of the cell, Garland Science, Taylor & Francis Group, **5**: 965-1114.
2. Amon, A. (1999): The spindle checkpoint. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 69-75.
3. Armond J. W., Vladimirov E., Erent M., Mcainsh A. D., Burroughs N. J. (2015): Probing microtubule polymerisation state at single kinetochores during metaphase chromosome motion. *J. Cell Sci.* **128**: 1991–2001.
4. Gennerich A., Vale R. D. (2009): Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps, *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 59–67.
5. Bissonette S, Stumpff J (2014): Quantifying mitotic chromosome dynamics and positioning, *J. Cell. Physiol.* **229**: 1301–1305
6. C. J. Lawrence, et al., (2004): A standardized kinesin nomenclature, *J. Cell Biol.* **167**: 19–22.
7. Canman, J.C., Salmon, E.D., and Fang, G. (2002): Inducing precocious anaphase in cultured mammalian cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **52**: 61–65.
8. Cheeseman I. M., Desai, A. (2008): Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 33-46.
9. Cimini, D., Cameron, L.A., and Salmon, E.D. (2004): Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes. *Curr. Biol.* **14**: 2149–2155.
10. Cooper G. M., Hausman R. E. (2004): Stanica: molekularni pristup, Zagreb, Medicinska naknada, **3**: 541-627.
11. Cottingham, F. R., Hoyt M. A. (1997): Mitotic spindle positioning in *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. *J. Cell Biol.* **138**: 1041–1053.
12. DeZwaan, T. M., Ellingson, E., Pellman, D., Roof, D. M. (1997): Kinesin-related KIP3 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for a distinct step in nuclear migration. *J. Cell Biol.* **138**: 1023–1040
13. Du, Y., English C. A., Ohi R. (2010): The kinesin-8 Kif18A dampens microtubule plus-end dynamics. *Curr. Biol.* **20**: 374–380.
14. Erent M., Drummond D. R., Cross R. A. (2012): *S. pombe* kinesins-8 promote both nucleation and catastrophe of microtubules. *PLoS One* **7**, e30738.

15. Luboshits G., Benayahu D. (2005): MS-KIF18A, new kinesin; structure and cellular expression. *Gene* **351**: 19-28.
16. Garcia M. A., Koonruga N., Toda T. (2002): Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. *Curr. Biol.* **12**: 610–621.
17. Goshima G., Wollman R., Stuurman N., Scholey J. M., and Vale R. D. (2005): Length control of the metaphase spindle. *Curr. Biol.* **15**: 1979–1988.
18. Grissom P. M., Fiedler T., Grishchuk E. L., Nicastro D., West R. R., McIntosh J. R. (2009): Kinesin-8 from fission yeast: A heterodimeric, plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement. *Mol. Biol. Cell* **20**: 963–972.
19. Gupta M. L., Jr., Carvalho P., Roof D. M., Pellman D. (2006): Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* **8**: 913–923.
20. Hirokawa, N., Takemura, R. (2003): Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 558– 565.
21. Hoyt M.A., Totis L., Roberts B. T. (1991): *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**, 507-517.
22. Inoue S., Salmon E. D. (1995): Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol. Biol. Cell* **6**: 1619–1640.
23. Jaqaman K., King E. M., Amaro A. C., Winter J. R., Dorn J. F., Elliott H. L., McHedlishvili N., McClelland S. E., Porter I. M., Posch M., Toso A., Danuser G., McAinsh A. D., Meraldi P., Swedlow J.R. (2010): Kinetochore alignment within the metaphase plate is regulated by centromere stiffness and microtubule depolymerases. *J. Cell Biol.* **188**: 665–679.
24. Jensen C. G. (1982): Dynamics of spindle microtubule organization: kinetochore fiber microtubules of plant endosperm. *J. Cell Biol.* **92**, 540-558.
25. Roostalu J., Surrey T. (2013): The multiple talents of kinesin-8. *Nat. Cell Biol.* **15**: 8
26. Kajtez J., Solomatina A., Novak M., Polak B., Vukušić K., Rüdiger J., Cojoc G., Milas A., Šumanovac Šestak I., Risteski P., Tavano F., Klemm A. H., Roscioli E., Welburn J., Cimini D., Glunčić M., Pavin N., Tolić I. M., (2016): Overlap

- microtubules link sister k-fibers and balance the forces on bioriented kinetochores, *Nat. Commun.* **7**: 1-11.
27. Kapitein L. C., Peterman E. J. G., Kwok B. H., Kim J. H., Kapoor T. M., Schmidt C. F. (2005): The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks, *Nature* **435**: 114–118.
 28. Krull, A., A. Steinborn, V. Ananthanarayanan, D. Ramunno-Johnson, U. Petersohn, and I. M. Tolic-Norrelykke. (2014): A divide and conquer strategy for the maximum likelihood localization of low intensity objects. *Opt Express.* **22**, 210-228.
 29. Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., et al. (2004): A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.* **167**: 19–22.
 30. Lukinavičius G., Reymond L., D’Este E., Masharina A., Göttfert F., Ta H., Güther A., Fournier M., Rizzo S., Waldmann H., Blaukopf C., Sommer C., Gerlich D. W., H.-D. Arndt, S. W. (2014): Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton, Hell & K. Johnsson; *Nat. Methods* **11**, 731–733.
 31. Maiato H., Rieder C. L., and Khodjakov A. (2004): Kinetochores-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J. Cell Biol.* **167**: 831–840.
 32. Mayr M. I., Hümmer S., Bormann J., Grüner T., Adio S., Woehlke G., Mayer T. U. (2007): The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr. Biol.* **17**: 488–498.
 33. McDonald, K.L., O’Toole, E.T., Mastronarde, D.N., and McIntosh, J.R. (1992): Kinetochores microtubules in PTK cells. *J. Cell Biol.* **118**: 369-383.
 34. Gardner M. K., Odde D. J., Bloom K. (2008): Kinesin-8 molecular motors: putting the brakes on chromosome oscillations. *Trends Cell Biol.* **18**: 310.
 35. Miki H., Okada Y., Hirokawa N., (2005): Analysis of the kinesin super-family: insights into structure and function, *Trends Cell Biol.* **15**: 467–476.
 36. Nezi L., Musacchio A. (2009): Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 785-795.
 37. Ohi R., Coughlin M. L., Lane W. S., Mitchison T. J. (2003): An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a KinI kinesin. *Dev. Cell* **5**, 309-321.

38. Pereira, A. J., Dalby, B., Stewart, R. J., Doxsey, S. J., Goldstein, L. S. (1997): Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **136**, 1081–1090.
39. Rieder C. L., Salmon E. D. (1994): Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle, *J. Cell Biol.* **124**: 223-33.
40. Rischitor P. E., Konzack S., Fischer R. (2004): The Kip3-like kinesin KipB moves along microtubules and determines spindle position during synchronized mitoses in *Aspergillus nidulans* hyphae. *Eukaryot. Cell* **3**: 632–645.
41. Sharp D. J., Rogers G. C., Scholey J. M. (2000): Roles of motor proteins in building microtubule-based structures: a basic principle of cellular design. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**: 128–141.
42. Skibbens R. V., Rieder C. L., Salmon E. D. (1995): Kinetochores motility after severing between sister centromeres using laser microsurgery: evidence that kinetochores directional instability and position is regulated by tension. *J. Cell Sci.* **108**: 2537–2548.
43. Skibbens R. V., Skeen V. P., Salmon E. D. (1993): Directional instability of kinetochores motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. *J. Cell Biol.* **122**: 859–875.
44. Skibbens R. V., Skeen V. P., Salmon E. D. (1993) Directional instability of kinetochores motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: A push-pull mechanism. *J. Cell Biol.* **122**: 859–875.
45. Skoufias D. A., Andreassen P. R., Lacroix F. B., Wilson L., Margolis R. L. (2001): Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle attachment and kinetochores-tension checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4492-4497.
46. Slangy A., Lane H. A., d' Hérin P., Harper M., Kress M., Nigg E. A. (1995): Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo*. *Cell* **83**: 1159–1169.
47. Stumpff J., von Dassow G., Wagenbach M., Asbury C., Wordeman L. (2008): The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochores movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev. Cell* **14**: 252–262.
48. Tang Z., Bharadwaj R., Li B., Yu H. (2001): Mad2-independent inhibition of APC^{cdc20} by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev. Cell* **1**: 227-237.

49. Tischer C., Brunner D., Dogterom M. (2009): Force- and kinesin-8-dependent effects in the spatial regulation of fission yeast microtubule dynamics. *Mol. Syst. Biol.* **5**: 250.
50. Titu M. A., Gilbert S. P. (1999): The diversity of molecular motors: an overview. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 181–183.
51. Tytell, J. D., Sorger, P. K. (2006): Analysis of kinesin motor function at budding yeast kinetochores. *J. Cell Biol.* **172**: 861–874.
52. Vale R. D., Reese T. S., Sheetz M. P. (1985): Identification of a novel force generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**: 39–50.
53. Vale R. D., Funatsu T., Pierce D. W., Romberg L., Harada Y., Yanagida T. (1996): Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* **380**: 451–453.
54. Vandenbeldt K. J., Barnard R. M., Hergert P. J., Meng X., Maiato H., McEwen B. F. (2006): Kinetochores use a novel mechanism for coordinating the dynamics of individual microtubules. *Curr. Biol.* **16**: 1217–1223.
55. Varga V., Helenius J., Tanaka K., Hyman A. A., Tanaka T. U., Howard J. (2006): Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat. Cell Biol.* **8**: 957–962.
56. Varga V., Leduc C., Bormuth V., Diez S., Howard J. (2009): Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. *Cell* **138**: 1174–1183.
57. Vladimirov E. et al. (2013): Nonautonomous movement of chromosomes in mitosis. *Dev. Cell* **27**: 60-71.
58. Walczak C. E., Cai S., Khodjakov A. (2010): Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 91-102.
59. Wan X., Cimini D., Cameron L. A., Salmon E. D. (2012): The coupling between sister kinetochore directional instability and oscillations in centromere stretch in metaphase PtK1 cells. *Mol. Biol. Cell* **23**: 1035–1046.
60. Waters J. C., Skibbens R. V., Salmon E. D. (1996): Oscillating mitotic newt lung cell kinetochores are, on average, under tension and rarely push. *J. Cell Sci.* **109**: 2823–2831.
61. Welburn J. P. I., Vleugel M. M., Liu D., Yates J. R., Lampson M. A., Fukagawa T., Cheeseman I. M. (2010): Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to

- differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol. Cell* **38**: 383–392.
62. West R. R., Malmstrom T., McIntosh J. R. (2002): Kinesins klp5+ and klp6+ are required for normal chromosome movement in mitosis. *J. Cell Sci.* **115**: 931–940.
63. Y.Imoto, Y.Yoshida, F.Yagisawa, H.Kuroiwa, T.Kuroiwa (2011): The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations. *J. Electron Microsc* **60** 117–136.
64. Zhu C., Zhao J., Bibikova M., Levenson J. D., Bossy-Wetzell E., Fan J. B., Abraham R. T., Jiang W. (2005): Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol. Biol. Cell* **16**: 3187–3199.

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Luka Bačić
Datum rođenja: 23.10.1992.
Mjesto rođenja: Osijek, 31000, Hrvatska
mail: lbacic054@gmail.com

OBRAZOVANJE

2014–danas Diplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno-
matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska)

2011–2014 Preddiplomski studij biologije, Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek (Hrvatska)