

Dinamika nastanka diobenog vretena

Kuzmić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:249389>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Barbara Kuzmić

Dinamika nastanka diobenog vretena

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Barbara Kuzmić

Dinamika nastanka diobenog vretena

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
magistra kemije

Zagreb, 2016.

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 i neposrednim vodstvom dr. sc. Jurja Simunića. Nastavnik: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Za početak, zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivi Tolić na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i vremenu koje mi je posvetila. Velika je čast i motivacija učiti od osobe tolikog opsega znanja koja svoj rad prezentira uvijek i isključivo s osmjehom na licu.

Neizmjereno hvala dr. sc. Jurju Simuniću što je svih ovih mjeseci bio uz mene i naučio me kako se radi sa stanicama, te kako se koriste eksperimentalne tehnike koje su bile potrebne za izradu ovog diplomskog rada. Također, hvala na svim korisnim komentarima i prenesenom znanju.

Posebno hvala i svim ostalim članovima Laboratorija za biofiziku stanice na brojnim znanstvenim savjetima i na prijateljskom odnosu. Prekrasno je biti član tako vesele grupe u kojoj su svi pojedinci odlični u onome što rade.

Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Nenadu Pavinu što me je upoznao s područjem i savjetovao mi da svoj diplomski rad izradim u Laboratoriju za biofiziku stanice. Također, hvala cijeloj Pavin grupi na brojnim znanstvenim savjetima koji su mi jako koristili pri izradi ovog rada.

Hvala doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec što je bila nastavnica ovog diplomskog rada.

Posebno hvala svim djelatnicima Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na prenesenom znanju. Čast je i privilegija biti student ovog fakulteta.

Nadalje, iskreno zahvaljujem svojim prijateljima koji su bili uz mene svih ovih godina. Velika ste podrška i bez Vas sam ništa. Hvala Vam na svim prekrasnim trenucima, a uvjerenam da najbolji tek dolaze. Budući da su prijatelji obitelj koju biramo sami, mogu samo reći da sam najbolje birala.

Na kraju, najviše hvala mojoj obitelji, roditeljima Ani i Josipu, sestrama Jeleni, Josipi, Petri i Luciji, te bratu Davidu što su mi omogućili da studiram ono što volim i pobrinuli se da mi nikad ništa ne nedostaje. Biti član velike obitelji neopisiva je sreća i privilegija. Zahvaljujem Vam na bezuvjetnoj ljubavi i što vjerujete u mene u trenucima kad ne vjerujem ni sama. Uz Vašu podršku mogu sve i vjerujem da je ovo tek početak.

Sadržaj

Sažetak	II
Abstract	III
Popis kratica	IV
1. Uvod	1
2. Literaturni pregled	2
2.1. Stanični ciklus	2
2.2. Regulacija staničnog ciklusa	3
2.3. Osnovni dijelovi diobenog vretena.....	8
2.3.1. Centrosomi	8
2.3.2. Mikrotubuli	9
2.3.3. Kinetohore	11
2.4. Oblik i nastajanje diobenog vretena	11
2.5. Stanice U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin)	14
2.6. Fluorescencijska mikroskopija	15
3. Materijali i metode	16
3.1 Stanična kultura.....	16
3.2. Priprema uzorka za mikroskopiranje.....	17
3.3. Mikroskopiranje živih stanica	17
3.3.1. Postavke korištene pri snimanju laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom.....	17
3.3.2. Postavke korištene pri snimanju „Swept-field“ konfokalnim mikroskopom	18
3.4. Analiziranje snimaka	18
4. Rezultati i rasprava.....	21
4.1. Duljine i širine prometafaznih diobenih vretena	21
4.2. Mjerenje konture i duljine „ogrlice“ diobenog vretena.....	26
4.3. Modificirani eksperimenti	29
4.3.1. T60.....	31
4.3.2. T30.....	34
5. Zaključak	38
6. Literatura	39
7. Prilozi	V
7.1. Životopis.....	V

Sažetak

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski ispit

Dinamika nastanka diobenog vretena

Barbara Kuzmić

Laboratorij za biofiziku stanice, Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Hrvatska
Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac
102A, 10000 Zagreb, Hrvatska

Na početku diobe, stanica formira diobeno vreteno, molekularnu strukturu odgovornu za jednaku raspodjelu kromosoma među stanicama kćerima. To je vrlo kompleksna struktura koju čine mikrotubuli i pripadajući proteini. Tijekom prometafaze, kinetohorni mikrotubuli rastu iz polova diobenog vretena prema drugom kraju stanice i povezuju se s kinetohorama, multi-proteinskim strukturama na centromerama kromosoma. U ovom radu, fluorescencijska mikroskopija je korištena za vizualizaciju ljudskih stanica. Vizualizirane su i analizirane U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanice. Pokazano je da se duljina diobenog vretena smanjuje, a širina povećava tijekom prometafaze. Unatoč promjenama duljine i širine diobenog vretena, kontura ove stanične strukture ostaje nepromijenjena.

(41 stranica, 25 slika, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Kemijski odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102A, 10000 Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: mitoza, prometafaza, diobeno vreteno, mikrotubuli, kinetohore, U2OS stanice, fluorescencijska mikroskopija

Mentor: Prof. dr. sc. Iva Tolić

Neposredni voditelj: dr.sc. Juraj Simunić

Nastavnik: Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Ocjenjivači: Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Doc. dr. sc. Josip Požar

Izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zamjena: Doc. dr. sc. Marko Močibob

Rad je prihvaćen: listopad 2016.

Abstract

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma thesis

Dynamics of mitotic spindle assembly

Barbara Kuzmić

Laboratory of cell biophysics, Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia
Division of Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac
102A, 10000 Zagreb, Croatia

At the onset of division, the cell forms a spindle, a molecular machine responsible for equal distribution of chromosomes between the daughter cells. It is a highly complex structure made of microtubules and associated proteins. During prometaphase, kinetochore microtubules extend from poles on either end of the cell and attach to the kinetochores, multi-protein structures on the centromeres of the chromosomes. In this thesis, fluorescence microscopy was used for live-cell imaging of human cells. U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) cells were visualized and analyzed. It was shown that the spindle length decreases and the width increases during the prometaphase. Despite the changes in spindle length and width, the contour of this cell structure remains unchanged.

(41 pages, 25 figures, 57 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb, Croatia

Key words: mitosis, prometaphase, mitotic spindle, microtubules, kinetochores, U2OS cells, fluorescence microscopy

Mentor: dr. sc. Iva Tolić, Prof.
Supervisor: dr.sc. Juraj Simunić
Instructor: dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Asst. Prof.
Reviewers: dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Asst. Prof.
dr. sc. Josip Požar, Asst. Prof.
dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.
Replacement: dr. sc. Marko Močibob, Asst. Prof.
Thesis accepted: October 2016

Popis kratica

Cdk – kinaze ovisne o proteinu ciklinu (engl. *cyclin dependent kinases*)

CKI – inhibitori kinaza ovisnih o ciklinu (engl. *cyclin dependent kinase inhibitor*)

APC/C – ubikvitin ligaza staničnog ciklusa (engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*)

SFC – ubikvitin ligaza koja se sastoji od podjedinica Skp1, Cullin i F-box

GFP – zeleni fluorescentni protein (engl. *green fluorescent protein*)

NEB – puknuće jezgrine ovojnice (engl. *nuclear envelope breakdown*)

MAP – proteini vezani uz mikrotubule (engl. *microtubule associated proteins*)

PRC1 – protein regulator citokineze 1, ne-motornih proteina koji se veže na preklapajuće dijelova antiparalelnih mikrotubula

DMEM – medij za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

FBS – serum koji potiče rast stanica (engl. *Fetal bovine serum*)

PBS – puferska otopina koja služi za ispiranje stanica (engl. *phosphate buffered saline*)

L-15 – bezbojan medij za mikroskopiranje (engl. *Leibovitz's medium*)

1. Uvod

Diobeno vreteno je bipolarna stanična struktura građena od mikrotubula i pripadnih motornih i ne-motornih proteina. Njegova zadaća je pravilno podijeliti genetički materijal stanice na dvije stanice kćeri tijekom mitoze. Ova visokoorganizirana struktura nastaje u prometafazi stanične diobe, a sam mehanizam nastanka do sad je slabo istražen. U ovoj će fazi doći do povezivanja mikrotubula s kromosomima pomoću kinetohora, proteinskih struktura. Sestrinske kinetohore će se povezivati sa snopovima mikrotubula koji nastaju iz suprotnih polova diobenog vretena. Do iduće faze mitoze, metafaze, svi će parovi sestrinskih kinetohora biti vezani na ovaj način, a to će omogućiti pravilnu diobu stanice.

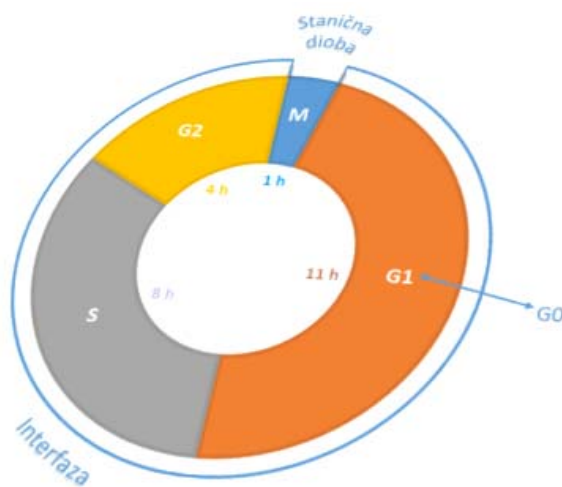
Ključna metoda proučavanja događaja u mitozu podrazumijeva korištenje fluorescencijske mikroskopije. Označavanjem pojedinih staničnih struktura fluorescentnim proteinima, moguće je vizualizirati dijelove stanice i pratiti dinamiku različitih proteina u živim stanicama. Korištenjem fluorescencijske mikroskopije moguće je snimati diobeno vreteno sloj po sloj, a kasnijom rekonstrukcijom dobivamo trodimenzionalni prikaz ove stanične strukture.

Cilj ovog rada bio je doći do novih saznanja vezanih uz izgled i oblik diobenog vretena u prometafazi. Iz tog su razloga mjerene duljine, širine i kontura ove prometafaze strukture. Samoorganizacija ove stanične strukture praćena je vizualizacijom pomoću laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa i „Swept – field“ konfokalnog mikroskopa. U eksperimentima su korištene ljudske tumorske stanice stanične linije U2OS koje stabilno ekspimiraju kinetohorni protein CENP-A obilježen zelenim fluorescentnim proteinom GFP (engl. *green fluorescent protein*) i tubulin obilježen fluorescentnim proteinom mCherry. Podaci dobiveni fluorescencijskom mikroskopijom analizirani su u programu ImageJ, a grafički su prikazani korištenjem programa MATLAB. Ovakva temeljna istraživanja stanične diobe mogu dovesti do novih spoznaja o formiranju diobenog vretena.

2. Literaturni pregled

2.1. Stanični ciklus

Stanični ciklus eukariotskih stanica čine četiri usklađena procesa, a to su rast stanice, replikacija genetičkog materijala, raspodjela udvostručenih kromosoma na dvije stanice kćeri i podjela stanice. Ovi procesi se odvijaju tijekom dva perioda na koje možemo podijeliti stanični ciklus. Prvi period je interfaza u kojoj se replicira DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) i stanica se pripremi za drugi dio ciklusa – staničnu diobu. Interfaza je duži period staničnog ciklusa, a podijeljena je na S fazu (engl. *synthesis*), te G1 i G2 fazu (engl. *gap*). Glavne promjene koje karakteriziraju interfazu događaju se u S fazi. Tada se udvostručuje DNA i stanica nastavlja ciklus sa dvostruko većim brojem kromosoma ($4n$). G1 je podfaza interfaze koja se odvija prije S faze, a karakterizirana je biosintezom proteina i mRNA (engl. *messenger ribonucleic acid*), te rastom stanice.¹ G2 je podfaza koja dolazi nakon S faze u interfazi. U ovoj fazi stanica dodatno raste i prolazi mehanizam provjere replicirane DNA. Na ovaj način se detektiraju i uklanjaju moguća oštećenja DNA prije početka diobe stanice.² Nakon G2 faze, započinje M faza (engl. *mitosis*) prilikom koje se udvostručeni kromosomi dijele u dvije jezgre, a taj proces nazivamo mitozu. Postupak dijeljenja cijele stanice u M fazi staničnog ciklusa nazivamo citokineza. Mitoza i citokineza ukupno traju oko sat vremena, a prosječna eukariotska stanica se dijeli približno svakih 24 sata. Dakle, stanica preko 95% vremena provodi u interfazi.¹ Raspored faza staničnog ciklusa, kao i vremenski period svake od njih, prikazan je na slici 1.



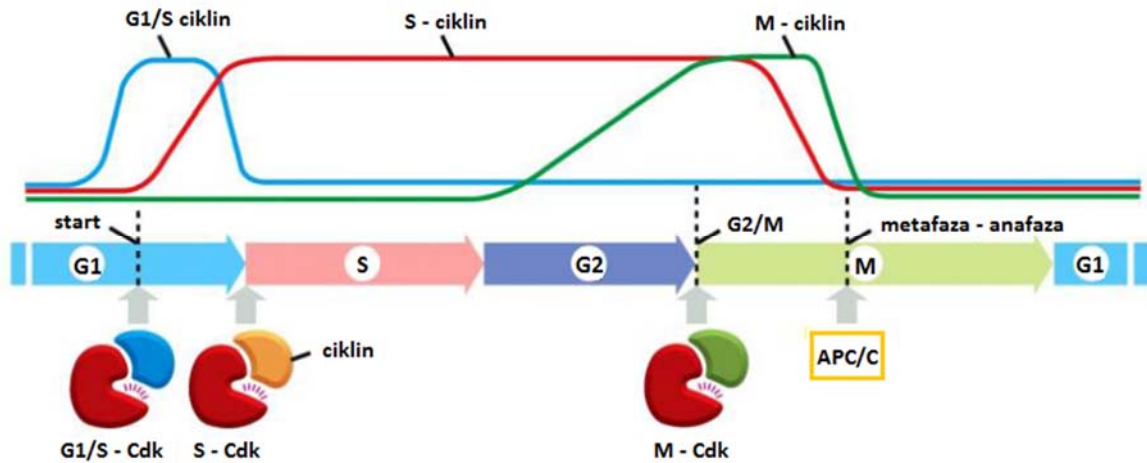
Slika 1. Raspored faza staničnog ciklusa i duljina trajanja pojedinih faza.

Na slici 1 je još prikazana i G0 faza u koju stanice mogu ulaziti iz G1 faze. Većina stanica se može vratiti iz G0 faze u G1 fazu kad su potrebne. Međutim, postoje i stanice koje trajno ostaju u G0 fazi, kao primjerice neuroni, a nazivaju se postmitotičke stanice. U ovoj su fazi stanice metabolički aktivne, ali se ne dijele.^{1,3}

2.2. Regulacija staničnog ciklusa

Regulacija staničnog ciklusa ovisi o različitim unutarstaničnim i izvanstaničnim signalima. Ukoliko se stanica nađe u nepovoljnim uvjetima ili ne može završiti s nekom fazom ciklusa, regulacijski sustav će zaustaviti stanični ciklus. Osnovne sastavnice sustava kontrole staničnog ciklusa su ciklini i ciklin-ovisne kinaze, Cdk (engl. *cyclin dependent kinases*). Ciklini su proteini koji aktivacijom ciklin ovisnih kinaza reguliraju prolazak stanice kroz stanični ciklus.⁴ Ove proteine prvi je opisao R. Timothy Hunt 1982. godine prilikom proučavanja staničnog ciklusa morskog ježa.⁵ Pojedini ciklini i kinaze ovisne o ciklinu formiraju ciklin-Cdk komplekse, a oscilacije u aktivnosti takvih kompleksa pokreću različite stanične procese. Tako će aktivacijom kompleksa ciklina S faze i Cdk (S-Cdk) započeti S faza staničnog ciklusa, a aktivacijom ciklina M faze i Cdk (M-Cdk) započinje mitozu. Pojedini će ciklini biti prisutni samo u fazi ciklusa kojeg oni potiču, a u ostalim fazama ciklusa ih nema. Mehanizmi koji kontroliraju aktivnost kompleksa ciklin-Cdk su fosforilacija podjedinica ciklin-ovisnih kinaza, vezanje Cdk inhibitora, CKI, (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor*) na komplekse ciklin-Cdk, te aktivnost ubikvitin – protein ligaza.⁶ Uloga ubikvitina je označavanje onih proteina koji će se razgraditi u proteasomu.⁷ Dvije najvažnije ubikvitin ligaze u regulaciji staničnog ciklusa su APC/C (engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*) i SCF ubikvitin ligaza, čiji naziv govori od kojih se podjedinica sastoji (Skp1, Cullin, F-box protein).⁸

U ranoj G1 fazi, ciklin-Cdk kompleksi su neaktivni. Na polovici G1 faze, ciklin-Cdk kompleksi aktiviraju transkripciju gena koji su neophodni za replikaciju DNA. U kasnoj G1 fazi će povećanje koncentracije G1/S ciklina dovesti do nastanka G1/S-Cdk kompleksa koji će omogućiti sintezu DNA aktivacijom ishodišta (engl. *origin*) replikacije DNA. Ovom ulasku u S fazu staničnog ciklusa prethodi korak u kojem SCF ubikvitin ligaza poliubikvitinira inhibitore ciklin-Cdk S faze, te se inhibitori razgrađuju u proteasomu. Na ovaj način omogućen je prolazak kontrolne točke staničnog ciklusa nazvane „start“, a opisani događaji prikazani su na slici 2.

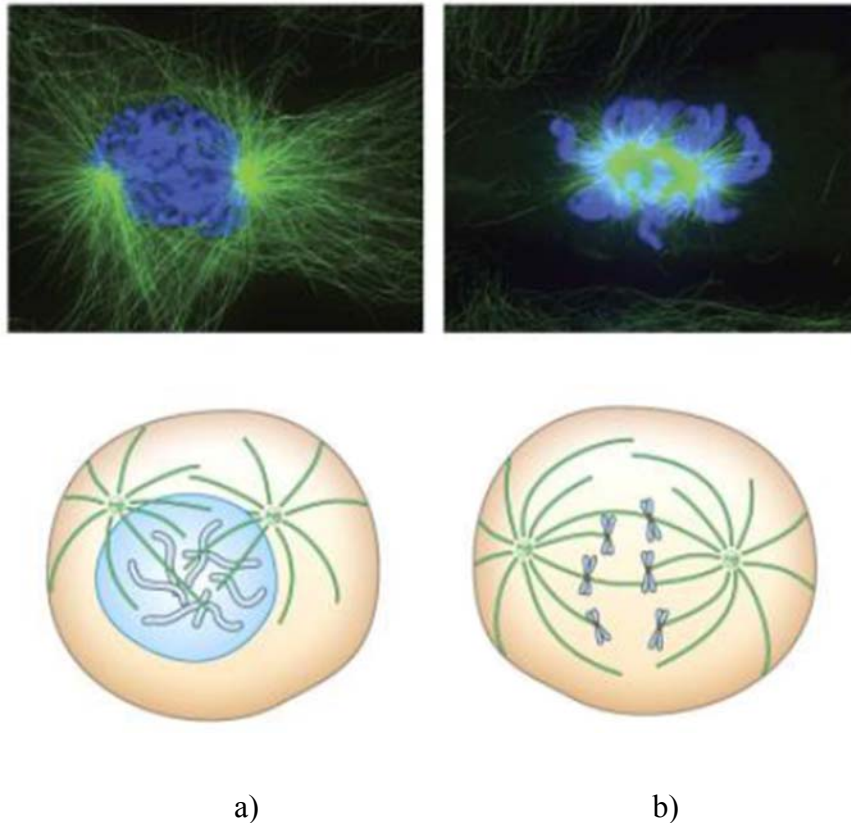


Slika 2. Prikaz sustava kontrole staničnog ciklusa koji ovisi o periodičkim aktivacijama ciklin-ovisnih kinaza odgovarajućim ciklinima.⁶

Nakon prijelaza točke „start“, započinje faza replikacije DNA i duplikacije kromosoma. Duplikacija kromosoma u S fazi uključuje točnu replikaciju čitave molekule DNA svakog kromosoma, ali i duplikaciju kromatinskih proteina koji su vezani za DNA. Nakon što je aktivirano ishodište replikacije u S fazi staničnog ciklusa, dolazi do razgradnje prereplikacijskih kompleksa i oni ne nastaju sve do iduće G1 faze. Na ovaj je način osigurano da se replikacijsko ishodište aktivira samo jednom u svakom pojedinom ciklusu.⁶ Kada je završena sinteza DNA, stanica ulazi u G2 fazu staničnog ciklusa. Kao što se može vidjeti na slici 2, u kasnoj G2 fazi kompleks mitotički ciklin-Cdk aktivira rane korake mitoze. Tada će doći do razgradnje jezgrine ovojnice što označava početak prometafaze. U toj će se fazi rekonstruirati mikrotubuli, kako bi nastalo diobeno vreteno, a sestrinske kromatide će se biorijentirano vezati na mikrotubule novonastale strukture. U daljnjim dijelovima ovog rada naglasak će biti upravo na prometafazi stanične diobe, točnije na samom formiranju diobnog vretena. Iz tog će razloga ovaj period mitoze biti detaljnije opisan.

U profazi stanične diobe počinje spiralizacija i zgušnjavanje kromatina i pritom nastaju kromosomi, koji se u stanici mogu gibati bez međusobnog zaplitanja. Budući da se kromatin skraćuje oko 10000 puta, zgnusnuti kromosomi se mogu vidjeti svjetlosnim mikroskopom.⁹ Svaki od njih sastoji se od dvije sestrinske kromatide koje su spojene u području centromera ili pričvrsnica. U ovom dijelu stanične diobe svaki centrosom počinje stvarati vlastite mikrotubule, počne se formirati diobeno vreteno, a taj će proces u idućim poglavljima biti detaljnije objašnjen. Događaj koji označava prijelaz iz profaze u prometafazu

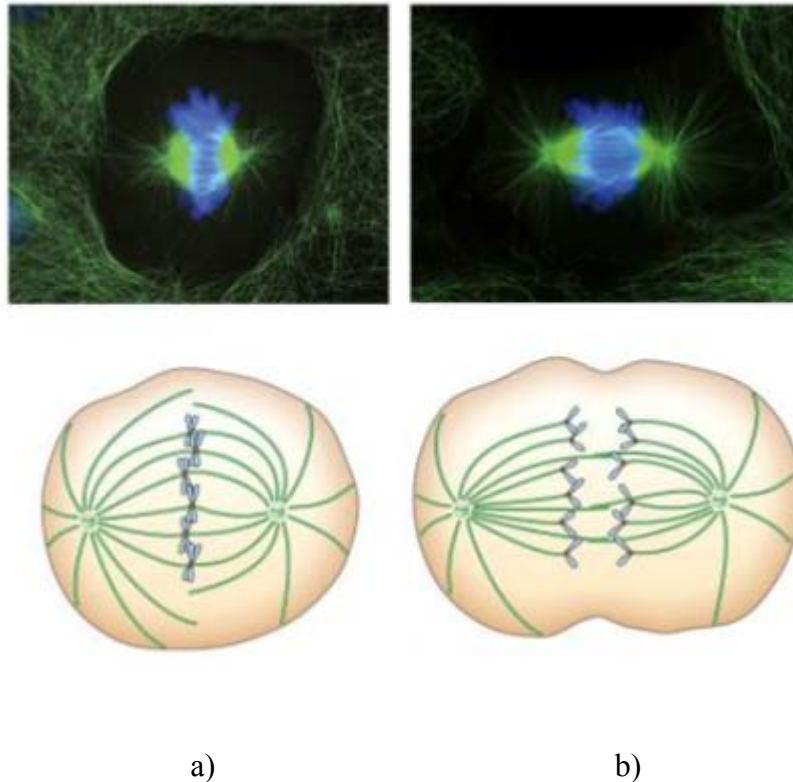
je puknuće jezgrine ovojnice, NEB (engl. *nuclear envelope breakdown*). Ovaj događaj je posljedica aktivnosti M-Cdk koja će fosforilirati proteine jezgrine ovojnice, a to će dovesti do depolimerizacije jezgrine ovojnice na manje komplekse.¹⁰ Prometafaza je razdoblje mitoze u kojem se kromosomi biorijentirano vežu sa snopovima mikrotubula, a o samom mehanizmu vezanja će biti više rečeno kasnije. Prikaz profaze i prometafaze dan je na slici 3.



Slika 3. Prikaz stanice u: a) profazi i b) prometafazi.⁶ Plavom bojom označeni su kromosomi, a zelenom bojom je označeno diobeno vreteno.

Iduća faza mitoze, nakon prometafaze, je metafaza u kojoj se kromosomi nalaze u ekvatorijalnoj ravnini u središtu stanice.⁹ Točnije, u ovoj su fazi svi kromosomi biorijentirani, a to znači da su sestrinske kinetohore kromosoma povezane sa snopovima mikrotubula koji dolaze iz suprotnih polova diobenog vretena. Za događaje u metafazi odgovorna je aktivnost M-Cdk, kao što je prikazano na slici 2. S druge strane, za događaje u idućoj fazi, anafazi, zaslužna je APC/C ubikvitin ligaza koja ubikvitinira nekoliko mitotičkih regulacijskih proteina i time ih predodređuje za razgradnju. U anafazi djelovanjem motornih proteina i depolimerizacijom mikrotubula dolazi do povlačenja kromatida prema suprotnim polovima

diobenog vretena, ali se kromatide ne razdvajaju dok APC/C ubikvitin ligaza ne označi protein sekurin za razgradnju.¹¹ Poliubikvitinacijom sekurina, odnosno razgradnjom navedenog proteina, doći će do razdvajanja sestrinskih centromera. Slika 4. prikazuje opisane događaje.

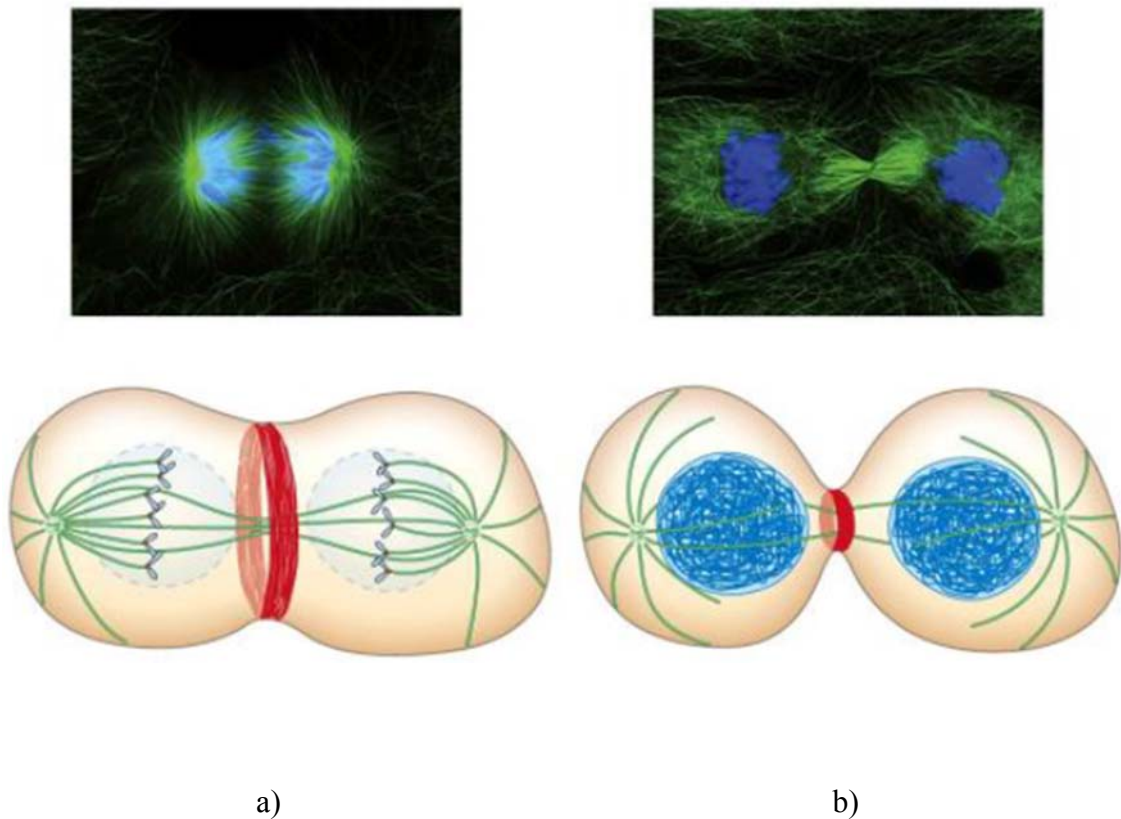


Slika 4. Prikaz stanice u: a) metafazi i b) anafazi.⁶ Plavom bojom označeni su kromosomi, a zelenom bojom je označeno diobeno vreteno.

Nakon što se kromosomi odvoje, APC/C ubikvitin ligaza poliubikvitinira mitotičke cikline. Time su mitotički ciklini označeni za razgradnju i razgrađuju se u proteasomima.⁶ Dakle, u tom trenutku nema više djelovanja kompleksa M-Cdk i započinje posljednja faza mitoze, telofaza. Djelovanjem fosfataze Cdc14 dolazi do dekonenzacije kromosoma, a u telofazi će još ponovno nastati jezgrina ovojnica i razgradit će se diobeno vreteno.¹² Događaji u stanici u ovoj fazi prikazani su na slici 5. a).

Nakon što u mitozu nastanu dvije jezgre kćeri, završava stanični ciklus te citokinezom dolazi do diobe stanice. Defosforilacijom svih proteina koje je fosforilirala M-Cdk dolazi do aktivacije citokineze. Prema tome, citokineza će započeti neposredno nakon anafaze u kojoj će APC/C ubikvitin ligaza ubikvitinirati i time predodrediti za razgradnju mitotičke

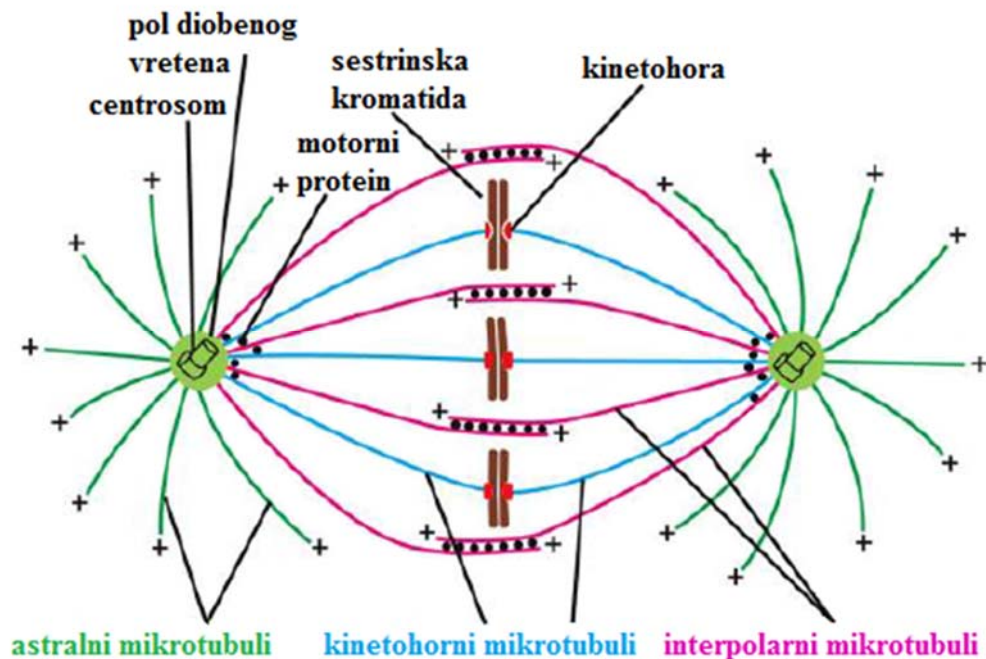
regulacijske proteine.⁶ Citokineza ovisi o kontrakciji prstena kojeg čine aktinska i miozinska vlakna.¹³ Kontrakcijski prsten nastaje na polovici udaljenosti između razdvojenih kromosoma, a njegovim stezanjem nastaje diobena brazda i stanica se podijeli. Kao što je prikazano na slici 2, nakon što završi citokineza, stanica ponovno ulazi u G1 fazu. U G1 fazi novonastala stanica raste i prati signale iz okoliša prije nego ponovno započne s novim ciklusom. Citokineza je prikazana na slici 5. b).



Slika 5. Prikaz stanice u: a) telofazi i b) citokinezi.⁶ Plavom bojom označeni su kromosomi, a zelenom bojom je označeno diobeno vreteno.

2.3. Osnovni dijelovi diobenog vretena

Na početku stanične diobe stanica konstruira diobeno vreteno. Uloga ovog složenog citoskeletnog mehanizma je da fizički podijeli genetički materijal između novonastalih stanica kćeri.¹⁴ U ovom će poglavlju biti opisani osnovni dijelovi ove stanične strukture, a klasični prikaz diobenog vretena dan je na slici 6.



Slika 6. Klasični prikaz diobenog vretena s označenim osnovnim dijelovima.⁶

2.3.1. Centrosomi

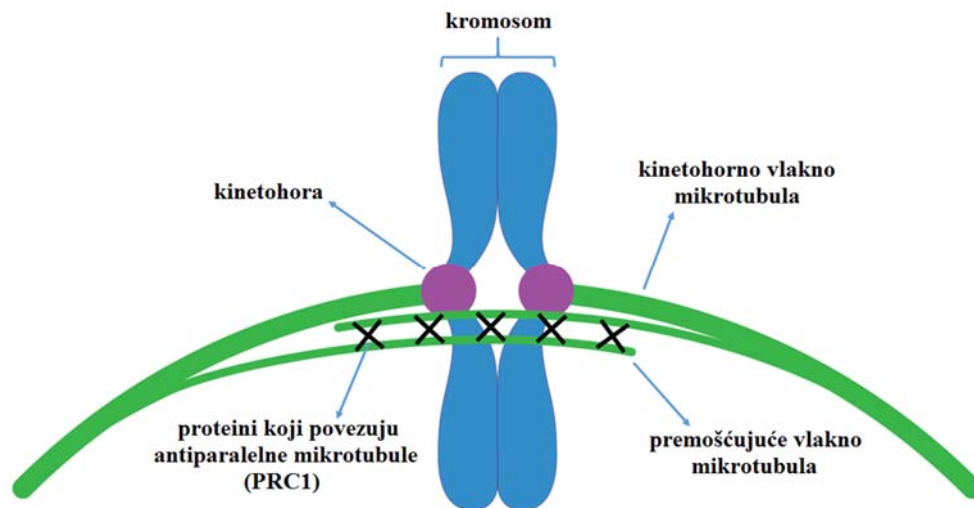
Centrosomi su stanične strukture koje su glavna organizacijska središta mikrotubula u stanici. Svaki centrosom izgrađuje par centriola koje se nalaze u pericentriolnom matriksu.¹⁵ U G1 fazi staničnog ciklusa centriole se razdvoje na nekoliko mikrometara. Tijekom S faze započinje rast centriola kćeri pokraj svake centriole majke i to pod kutom od 90°. Majčinska centriola je dulja i kompaktnije građena od centriole kćeri. U G2 fazi završava elongacija centriola kćeri, ali parovi centriola ostaju i dalje blizu sve do početka M faze. Kad stanice uđu u M fazu stanične diobe, dvije polovice repliciranog centrosoma se podijele i udalje kako bi započele stvaranje polova diobenog vretena. U toj će fazi diobe svaki centrosom započeti stvarati vlastite mikrotubule.¹⁶

2.3.2. Mikrotubuli

Mikrotubuli su stanični filamenti koji imaju ključnu ulogu u diobi stanica.¹⁷ Građeni su od heterodimernog proteina tubulina čije su podjedinice α -tubulin i β -tubulin. Podjedinice tubulina izgrađuju protofilamente, a kružnim povezivanjem 13 protofilamenata nastaju mikrocejevčice nazvane mikrotubuli. Mikrotubuli nastaju polimerizacijom heterodimera α -tubulina i β -tubulina uz energiju koja se oslobađa hidrolizom GTP-a.¹ Pri polimerizaciji se javlja brzorastući „plus“ kraj kojem je izložen β -tubulin, dok je na spororastućem „minus“ kraju vlakna izložen α -tubulin. Osim što će mikrotubuli polimerizacijom rasti, oni se mogu i skraćivati depolimerizacijom. Ovaj fenomen izmjene rasta i skraćivanja mikrotubula nazvan je dinamička nestabilnost.¹⁸ Uz mikrotubule se vežu proteini poput MAP (engl. *microtubule associated proteins*) proteina i motornih proteina (kinezini i dineini).¹⁹

Mikrotubule možemo podijeliti na kinetohorne i ne-kinetohorne mikrotubule. Kinetohorni mikrotubuli su paralelni filamenti koji se polimeriziraju iz centrosoma i pričvršćuju na kinetohore kao kinetohorna vlakna, k-vlakna (engl. *k-fibers*). S druge strane, ne-kinetohorni mikrotubuli se neće vezati na kinetohore, već će međusobno stvarati preklapajuće regije kao antiparalelni snopovi.²⁰ Ovi ne-kinetohorni mikrotubuli, koji u središnjem dijelu diobenog vretena stvaraju antiparalelne nizove, nazivaju se interpolarni mikrotubuli. Treba napomenuti kako postoje i ne-kinetohorni mikrotubuli koji polimeriziraju radijalno od polova diobenog vretena. Oni povezuju diobeno vreteno sa staničnim korteksom, a zbog smjera rasta su nazvani astralni mikrotubuli.^{6,21}

Posljednjih godina dokazano je postojanje još jedne vrste mikrotubula koji se nalaze u velikoj blizini sestrinskih kinetohora i tvore strukturu koja podsjeća na most. Iz tog je razloga ova nova vrsta mikrotubula nazvana premošćujući mikrotubuli (engl. *bridging microtubules*), a vlakna koja tvore su premošćujuća vlakna.^{14, 20} Ova ne-kinetohorna vlakna u blizini kinetohornih vlakna, a između sestrinskih kinetohora, prethodno su uočena i elektronskom mikroskopijom.²³⁻²⁵ Da postoji poveznica između premošćujućih mikrotubula te sestrinskih kinetohora i kinetohornih vlakana pokazano je laserskom ablacijom. Laserska ablacija podrazumijeva postupak zarezivanja kinetohornog vlakna diobenog vretena. Kao rezultat ablacije dobiveno je zajedničko kretanje premošćujućeg vlakna, snopa mikrotubula koji nije ablatiran, sestrinskih kinetohora i dijela ablatiranog kinetohornog vlakna. Takav rezultat potvrđuje povezanost premošćujućeg vlakna s kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama u jedinstveni element.^{20, 25-27} Nova vrsta mikrotubula prikazana je na slici 7.



Slika 7. Prikaz strukture koja obuhvaća premošćujuće vlakno povezano s kinetohornim vlaknom i pritom se nalazi između sestrinskih kinetohora. Pojedini elementi ove strukture označeni su na slici.²⁸

Valja još napomenuti, kao što se vidi na slici 7, da je premošćujuće vlakno vrsta antiparalelnog vlakna. Kako bi se pokazalo da je ovo vlakno sastavljeno od ne-kinetohornih mikrotubula koji se doista preklapaju antiparalelno, upotrebljen je protein regulator citokineze 1, PRC1 (engl. *protein regulator of cytokinesis*).²⁰ PRC1 protein je član obitelji Ase1p nemotornih proteina koji se veže na preklapajuće dijelova antiparalelnih mikrotubula.²⁹ Označavanjem ovog proteina, vizualizacijom i eksperimentima u kojima je korištena metoda laserske ablacije, dokazano je da se mikrotubuli u premošćujućem vlaknu zaista preklapaju antiparalelno.²⁰

2.3.3. Kinetohore

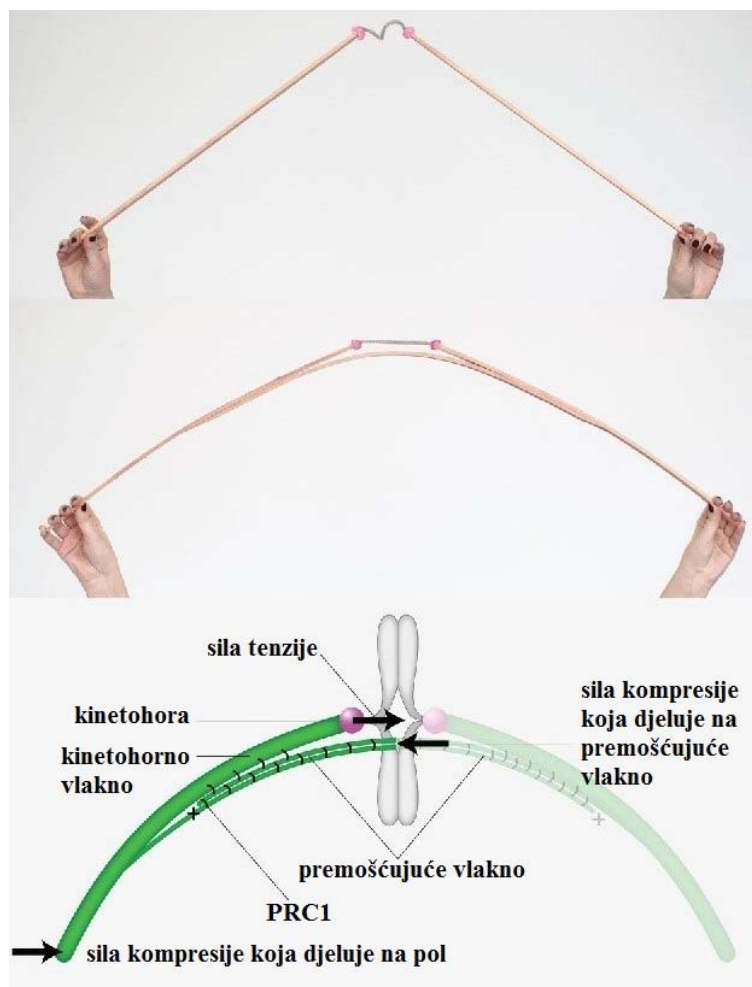
Kinetohore su proteinske strukture na kromatidama čija je uloga povezivanje kromosoma sa snopovima mikrotubula diobenog vretena. Pravilno povezivanje mikrotubula i kromosoma krucijalno je za ispravno dijeljenje stanice.³⁰ Kinetohorni kompleks se može podijeliti na unutarnji dio koji je usko povezan s centromernom DNA i vanjski dio koji omogućuje povezivanje s mikrotubulima. Jedan od proteina unutarnjeg dijela kinetohornog kompleksa je centromerni protein CENP-A. Ovaj protein od 17 kDa po strukturi i svojstvima sličan je histonu H3, a posebno je istaknut jer će kasnije biti spominjan u ovom radu.^{31, 32}

Tijekom prometafaze, mikrotubuli će polimerizacijom rasti iz centrosoma i nasumičnim gibanjem tražiti kinetohore te se povezivati s njima. U trenutku kad se obje sestrinske kinetohore povežu sa snopovima mikrotubula, koji dolaze sa suprotnih polova stanice, kažemo da je postignuta biorijentacija. Tek kad su svi kinetohorni parovi povezani na opisani način, stanica može ući u anafazu.^{33, 34}

2.4. Oblik i nastajanje diobenog vretena

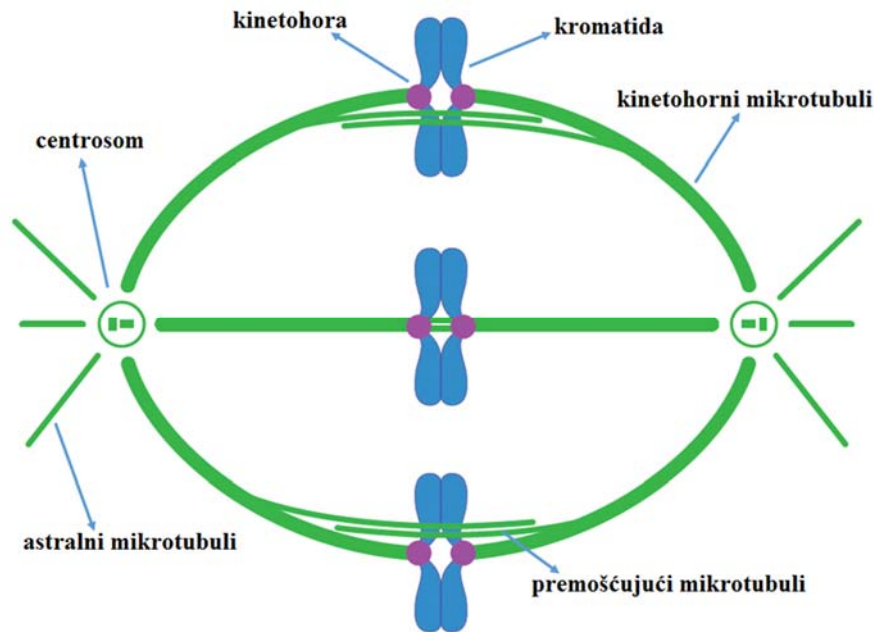
U prethodnom poglavlju dan je kratak pregled osnovnih komponenata diobenog vretena. Objasnjeno je kako će polimerizacijom iz centrosoma nastajati kinetohorni i ne-kinetohorni snopovi mikrotubula. Kinetohorni mikrotubuli će sudjelovati u odvajanju sestrinskih kinetohora, interpolarni mikrotubuli će održavati bipolarnost diobenog vretena, a uloga astralnih mikrotubula je da povezuju diobeno vreteno sa staničnim korteksom.²⁸ Spomenuta je i nova klasa mikrotubula, premošćujući mikrotubuli, a sada će biti objašnjeno kakav je njihov utjecaj na oblik diobenog vretena.

Promatranjem oblika diobenog vretena, primijećeno je da je duljina kinetohornih vlakana veća od udaljenosti između centrosoma. To upućuje na prisutnost sila kompresije na mikrotubule na mjestima centrosoma. S druge strane, centromerna regija je rastegnuta u metafazi stanične diobe, a to je posljedica sile prema polovima diobenog vretena. Dakle, sestrinske kinetohore su pod tenzijom.²⁰ Kompresija na polovima i tenzija između kinetohora uravnotežene su ukoliko postoje premošćujući mikrotubuli koji povezuju kinetohorna vlakna vezana na sestrinske kinetohore. Tako je zakrivljeni oblik diobenog vretena posljedica sila unutar ove strukture.²⁵ Ovaj raspored sila prikazan je na slici 8.



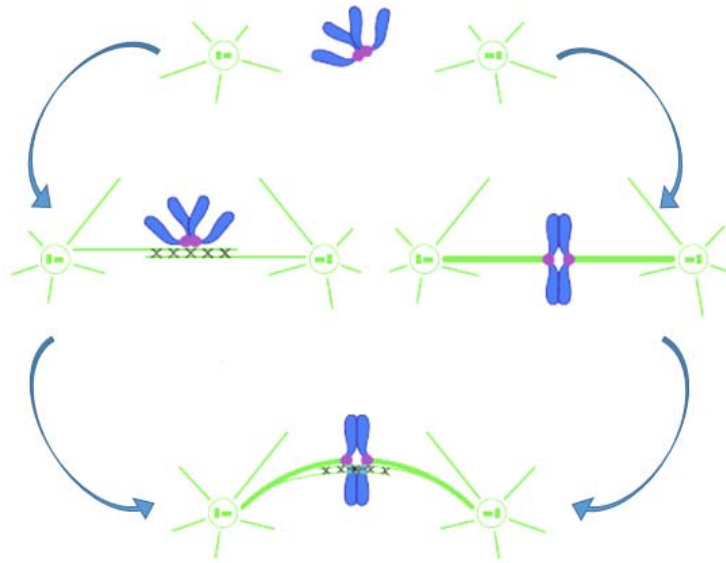
Slika 8. Razni prikazi premošćujućeg vlakna, važnog strukturnog elementa koji omogućuje uravnotežavanje sila i održavanje oblika diobenog vretena. Uloga premošćujućeg vlakna pri uravnotežavanju sila prikazana makroskopskim modelima napravljenim od drvenih štapova i užeta. Model s dva štapa nije zakrivljen i uže je opušteno, dok se kod modela s tri štapa vidi prepoznatljiv konveksan oblik kao posljedica kompresije te uže koje je napeto.²⁵

Osim što su premošćujući mikrotubuli vizualizirani konfokalnom mikroskopijom, njihovo je postojanje potvrđeno i pokusima u kojima je korištena laserska ablacija. Kao rezultat ablacije dobiveno je zajedničko izravnjanje premošćujućeg vlakna, snopa mikrotubula koji nije ablatiran, sestrinskih kinetohora i dijela ablatiranog kinetohornog vlakna, a to je logičan odgovor sustava na koji djeluju sile kompresije. Također, praćena je i pozicija sestrinskih kinetohora u vremenu nakon laserske ablacije i dobiveno je da se udaljenost među njima smanjuje. Prema tome, smanjenjem tenzije, koja je bila uzrokovana vezanjem kinetohora na kinetohorna vlakna, dolazi do relaksacije i smanjenja udaljenosti među kinetohorama.²⁰ Prikaz diobenog vretena koji uključuje premošćujuća vlakna dan je na slici 9.



Slika 9. Model diobenog vretena s prikazanim centrosomima iz kojih izlaze astralni mikrotubuli, kinetohorni mikrotubuli vezani na kinetohore koje se nalaze na kromosomima i premošćujući mikrotubuli. Interpolarni mikrotubuli nisu prikazani.²⁸

Sad kada je objašnjena važnost premošćujućih vlakna u formiranom diobenom vretenu, postavlja se pitanje kako nastaje ova struktura u prometafazi. Predložena su dva scenarija koja odgovaraju na ovo pitanje. U prvom slučaju pretpostavlja se da kinetohore stupaju u interakciju s antiparalelnim vlaknom, koje postaje premošćujuće vlakno, a tek potom dolazi do vezanja kinetohornih vlakana na sestrinske kinetohore. Dakle, ovaj scenarij predviđa da sve kreće od antiparalelnog vlakna (engl. *Bridge first*). Drugi scenarij predviđa kako će prvo doći do povezivanja kinetohornih vlakana sa sestrinskim kinetohorama i biorijentacije, a tek potom do povezivanja s premošćujućim vlaknom.²⁸ Ova dva scenarija vizualno su predložena na slici 10.



Slika 10. Prikaz dva moguća scenarija povezivanja kinetohora s mikrotubulima.²⁸

Prema dosadašnjim saznanjima prvi scenarij, pri kojem prvo nastaje premošćujuće vlakno, je izgledniji. Tome u prilog ide činjenica da se kromosomi mogu poredati u ekvatorijalnoj ravnini bez funkcionalnih kinetohornih vlakana, klizeći po interpolarnim vlaknima pomoću motornog proteina CENP-E.³⁵ Motorni protein CENP-E je centromerni protein, član obitelji kinezina, koji povezuje centromere s mikrotubulima diobenog vretena i prenosi kromosome do ekvatorijalne ravnine.³⁶ Daljnja istraživanja na ovom području će pokazati je li ova pretpostavka točna.

2.5. Stanice U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin)

Stanice U2OS su humane stanice osteosarkoma, primarnog malignog tumora kosti.³⁷ U ovim stanicama specifično su povezani fluorescentni proteini s proteinima od interesa. Tako je metodama genetičkog inženjerstva gen za zeleni fluorescentni protein GFP povezan s genom za centromerni protein CENP-A, koji je već spomenut u ovom radu. Također, gen za crveni fluorescentni protein mCherry povezan je s genom za α -tubulin i tako dobivena rekombinantna DNA unesena je u stanicu.³⁸ Ekspresijom rekombinantnih gena dolazi do sinteze fuzijskih proteina koji imaju fluorescencijsku oznaku. Takvim označavanjem moguće je pratiti njihovo kretanje upotrebom fluorescencijske mikroskopije.³⁹

Zeleni fluorescentni protein, GFP, je protein male molekulske mase, a sastavljen je od 238 aminokiselina. Tercijarnu strukturu ovog proteina čini jedanaest međusobno povezanih β -lanaca koji zajedno tvore strukturu nazvanu β -bačva. U unutrašnjosti ove strukture se nalazi α -zavojnica, a iz dijela aminokiselina koje čine α -zavojnicu nastaje fluorescentni kromofor koji je odgovoran za fluorescenciju ovog proteina.⁴⁰

Fluorescentni protein mCherry je najstabilniji i najkorišteniji pripadnik skupine mFruits fluorescentnih proteina. Radi se o šest fluorescentnih proteina koji imaju maksimume emisije u području od 540 nm do 610 nm, a dobili su imena prema engleskim nazivima voća slične boje.⁴¹ Ovaj crveni, monomerni, fluorescentni protein ima vrlo sličnu tercijarnu strukturu kao zeleni fluorescentni protein.⁴²

Tercijarna struktura fluorescentnih proteina je jedno od svojstava koje omogućuje primjenu fluorescencijske mikroskopije za vizualizaciju i praćenje dinamike staničnih struktura. Budući da se N-kraj i C-kraj fluorescentnih proteina nalaze izvan β -bačve, mogu se lako povezivati s drugim proteinima. S druge strane, kromofori se nalaze unutar β -bačve, a taj položaj im osigurava zaštitu od vanjskih utjecaja i omogućuje stabilnost. Tako fluorescentni proteini zadržavaju fluorescenciju ukoliko se promijeni pH ili temperatura, a ne smetaju im ni kemikalije koje se koriste za tretiranje stanica u biološkim istraživanjima.^{43,44}

2.6. Fluorescencijska mikroskopija

Korištenje fluorescencijskih mikroskopa ima važnu ulogu u proučavanju diobenog vretena.⁴⁵ Ovakav tip mikroskopije pruža mogućnost optičkog seciranja, odnosno snimanja uzorka sloj po sloj u smjeru optičke osi mikroskopa. Kasnijom rekonstrukcijom snimljenih ravnina dobiva se trodimenzionalna slika snimanih bioloških struktura koje su obilježene fluorescentnim proteinima. Predmet snimanja osvjetljava se točku po točku, koristeći difrakcijom ograničen točkasti izvor svjetla, najčešće fokusiranu lasersku zraku. Signal iz osvjetljenog područja strukture koju snimamo oslikava se pomoću optike mikroskopa i projicira na točkastu aperturu koja se nalazi neposredno ispred detektora. Kao detektor se može koristiti fotomultiplikator, a on pretvara snop fotona u električni signal. Ukoliko se ulazna apertura detektora nalazi u optičkoj ravnini koja je **konjugirana fokalnoj** ravnini objektiva, fluorescencijski će se mikroskop još nazivati konfokalni mikroskop.⁴⁶

3. Materijali i metode

3.1 Stanična kultura

Za provođenje eksperimenata korištena je stanična linija U2OS kod koje stanice stabilno ekspimiraju centromerni protein A obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (CENP-A-GFP) i tubulin obilježen crvenim fluorescentnim proteinom (mCherry- α -tubulin). Ove stanice poklonili su dr. sc. Marin Barišić i dr. sc. Helder Maiato (Institut za molekularnu i staničnu biologiju, Sveučilište u Portu, Portugal) Laboratoriju za biofiziku stanice. Radi se o adherentnim stanicama koje rastu u DMEM mediju (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Bazel, Švicarska).⁴⁷ U DMEM medij za održavanje stanica dodano je 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a (engl. *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), 50 $\mu\text{g/mL}$ geneticina (Life Technologies, Waltham, SAD), 100 I.U./mL penicilina (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Ovako pripremljen medij za održavanje stanica potrebno je filtrirati.

Nakon 72 sata, kad stanice dosegnu konfluentnost, potrebno je ukloniti medij i isprati ih dva puta s 5 mL sterilnog PBS pufera (1%) (engl. *Phosphate-buffered saline*). Ispiranje PBS puferom služi za uklanjanje preostalog medija. Kako bi se odvojile stanice od podloge, dodaje se 1 mL 1%-tne otopine tripsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i inkubira 5 minuta. Odljepljene stanice se pomiješaju s 2 mL medija i 500 μL takve homogene smjese stavljamo u novu posudu za uzgoj (engl. *Cell Culture Flask*)(Falcon). U novu posudu prethodno dodamo 4,5 mL medija za održavanje stanica. Stanice čuvamo u inkubatoru (Galaxy 170S, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) pri 37 °C i 5% CO₂.

Sastav PBS pufera (1%):⁴⁸

8,0 g/L NaCl

0,2 g/L KCl

1,42 g/L Na₂HPO₄

0,24 g/L KH₂PO₄

pH 7,4

3.2. Priprema uzorka za mikroskopiranje

Prilikom prethodno opisanog presađivanja stanica potrebno je pripremiti uzorke za mikroskopiranje. Nakon što neutraliziramo djelovanje tripsina dodatkom 2 mL DMEM medija sa suplementima, različite volumene medija sa stanicama dodamo u posudice za mikroskopiranje. U posudice prethodno stavimo 3 mL medija za uzgoj stanica. Posudice za mikroskopiranje su plastične, a na dnu se nalazi staklo promjera 35 mm i debljine 1,5 mm (MatTek Corporation, Ashland, SAD). Pripremljene stanice se čuvaju u inkubatoru pri 37 °C i 5% CO₂. Nakon 48 sati potrebno je ukloniti DMEM hranjivi medij i dodati L-15 (Leibovitz) medij za mikroskopiranje (Life Technologies).⁴⁹ Pritom je i u L-15 medij dodano 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 50 µg/mL geneticina, 100 I.U./mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina. Ovaj medij omogućuje rast stanica u okolini u kojoj količina CO₂ nije kontrolirana, a budući da ne sadrži autofluorescentne indikatore kiselosti, pogodan je za fluorescencijsku mikroskopiju. Nekoliko sati nakon dodatka L-15 medija stanice su spremne za mikroskopiranje.

3.3. Mikroskopiranje živih stanica

3.3.1. Postavke korištene pri snimanju laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom

Dio stanica je sniman Leica TCS SP8 FILM konfokalnim mikroskopom s Leica HC PL APO 63x/1.40 CS2 uljnim imerzijskim objektivom (Leica, Wetzlar, Njemačka).⁵⁰ Objektiv se nalazi unutar komore za zagrijavanje H101-1x35-PRIOR-NZ100 (Okolab, Pozzuoli, Italija) koja je povezana s CO₂-UNIT-BL (Okolab, Pozzuoli, Italija) sustavom za kontrolu količine CO₂. Korištenjem ovog sustava, u komori su postignuti pogodni uvjeti za dijeljenje stanica, 37 °C i 5% CO₂. Budući da su snimane U2OS stanice (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin), odabrane su pobudne laserske linije valnih duljina 488 nm i 532 nm. Karakteristika laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa je točkasta izlazna apertura (engl. *pinhole*). Za dio eksperimenata je prilikom svakog snimanja odabrano 15 Z-ravnina koje prekrivaju diobeno vreteno, a razmak između dvije susjedne ravnine iznosio je 0,5 µm. Ravnine su snimane svakih 5 sekundi, a duljina snimanja pojedinih stanica se razlikuje.

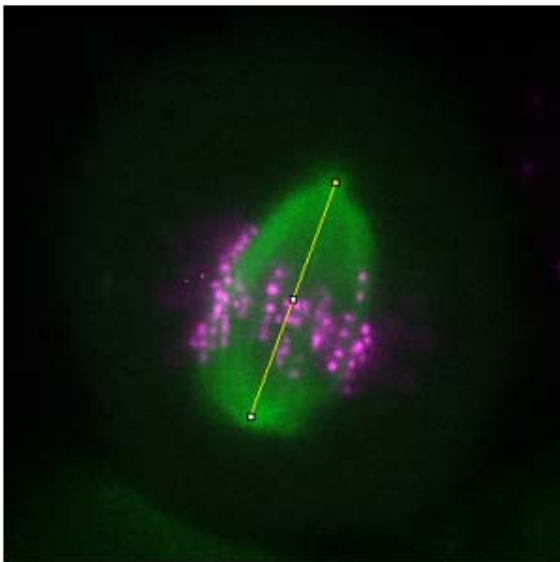
3.3.2. Postavke korištene pri snimanju „Swept-field“ konfokalnim mikroskopom

Stanice opisane u ovom radu snimane su i „Swept-field“ konfokalnim mikroskopom. Ovaj vezani sustav se sastoji od Opterra I (Bruker Nano Surfaces, Middleton, SAD) inverznog konfokalnog sistema koji omogućuje snimanje velikom brzinom, a dizajniran je tako da ga je moguće povezati sa standardnim mikroskopima. Točnije, povezan je s Nikon TI-E inverznim mikroskopom (Nikon, Tokyo, Japan). Ovako posložen mikroskop nudi mogućnost odabira aperture. Kao i kod standardnog konfokalnog mikroskopa, moguće je odabrati točkaste aperture (30, 45, 60 μm), a posebnost ovog sustava je mogućnost odabira proreza (engl. *slits*) (22, 35, 50, 75 μm). Različite aperture omogućuju optimizaciju rezolucije, brzine i količine svjetlosti koja prolazi kroz aperturu. Tako će odabir točkaste aperture rezultirati boljom rezolucijom, a prorezi će biti pogodniji za brža i blaža snimanja stanica. Za snimanje stanica koje će biti prikazane u ovom radu odabrani su prorezi od 35 μm . Nadalje, korišten je Nikon CFI Plan Apo VC 100x uljni imerzijski objektiv (Nikon, Tokyo, Japan). Posudica sa stanicama se, kao i kod laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa, stavlja unutar komore za zagrijavanje H301-K-frame (Okolab, Pozzuoli, Italija) gdje se nalazi objektiv. U komori je temperatura 37 °C.²⁷ Odabrane su pobudne laserske linije valnih duljina 488 nm i 561 nm. U svakom eksperimentu snimane su 3 Z-ravnine koje prekrivaju središnji dio diobenog vretena, a razmak između dvije susjedne ravnine iznosio je 1 μm . Ravnine su snimane svakih 60 ili svakih 30 sekundi, a duljina snimanja pojedinih stanica se razlikuje.

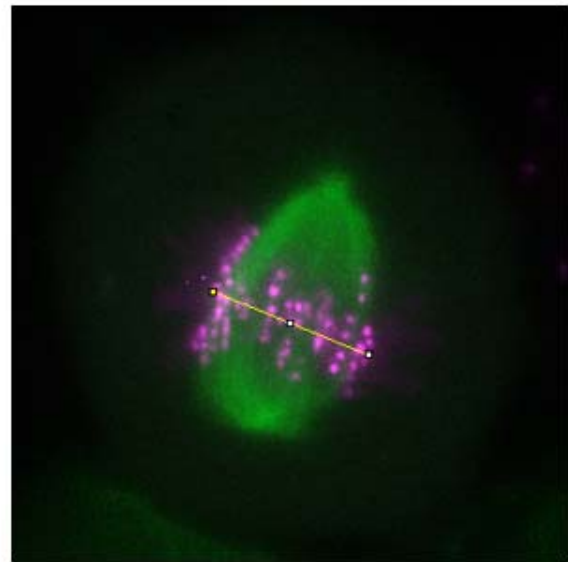
3.4. Analiziranje snimaka

Za analizu mikroskopskih snimaka korišten je ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, SAD). ImageJ je javno dostupan program koji se temelji na programskom jeziku Java (Oracle Corporation, Redwood, SAD) što omogućuje korištenje programa na svim operativnim sustavima.⁵¹ Program sadrži traku izbornika (engl. *menu bar*), alatnu traku (engl. *tool bar*) i traku pozicije (engl. *status bar*). Alatna traka sadrži razne opcije za približavanje, označavanje i pomicanje slike. Kako bi se odredile duljine pojedinih dijelova diobenog vretena, koriste se alati linija. Tako se može koristiti ravna linija (engl. *straight line*), segmentirana linija (engl. *segmented line*) i rukom iscrtana krivulja (engl. *freehand line*). Traka pozicije u svakom trenutku pokazuje koordinate nactane linije i duljinu objekta koji mjerimo.⁵² Ravnom linijom mjerene su duljine i širine diobenih vretena. Segmentiranim

linijama mjerene su konture diobenih vretena i duljine „ogrlice“ koju čine kinetohore. Duljina svakog diobenog vretena mjerena je kao udaljenost između centrosoma, pritom linija započinje i završava u centru svakog od centrosoma, kao što je prikazano na slici 11 a). Širina je mjerena kao udaljenost između vanjskih, najudaljenijih snopova mikrotubula, kao što je prikazano na slici 11 b).



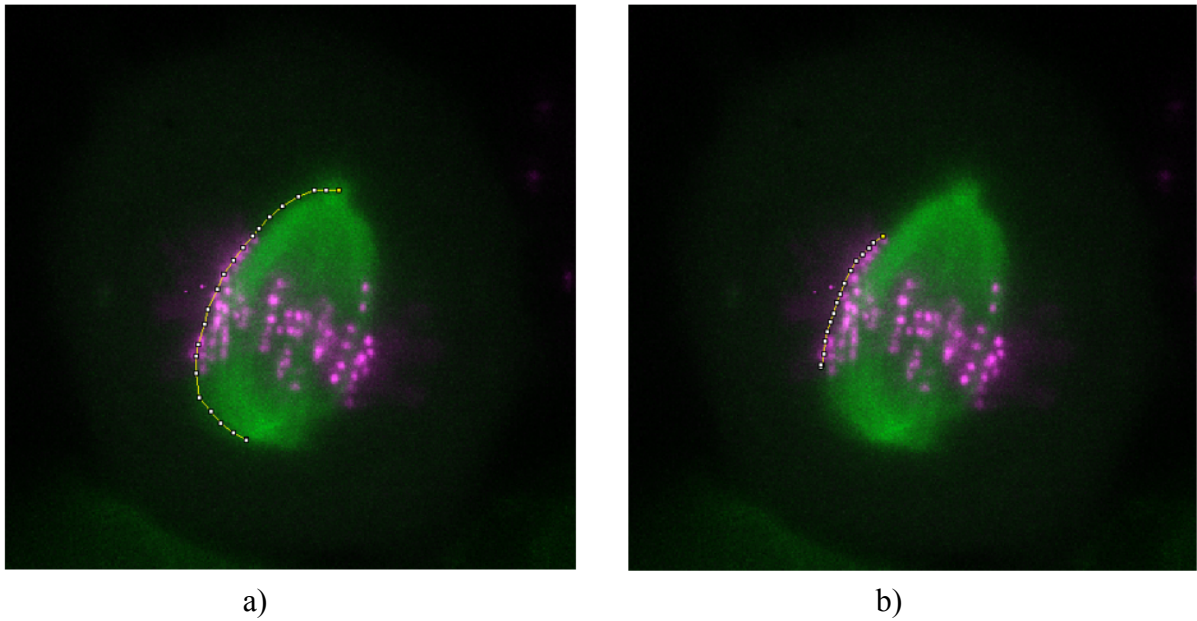
a)



b)

Slika 11. Korištenjem programa ImageJ moguće je ravnom linijom mjeriti: a) duljinu i b) širinu diobenog vretena. Mikrotubuli diobenog vretena prikazani su zelenom bojom, a kinetohore ljubičastom.

Određivanje duljine konture pojedinog diobenog vretena pokazano je na slici 12 a). Dakle, segmentiranom se linijom označava vanjski snop mikrotubula od sredine jednog centrosoma do sredine drugog centrosoma. Duljina „ogrlice“ je dio konture koji je prekriven kinetohorama, a mjerenje duljine „ogrlice“ prikazuje slika 12 b). Za sve analizirane stanice praćena je promjena prethodno definiranih veličina u vremenu. Podaci dobiveni u programu ImageJ obrađeni su i grafički prikazani u programu MATLAB (MathWorks, Natick, SAD).⁵³



Slika 12. Korištenjem programa ImageJ moguće je segmentiranom linijom mjeriti: a) duljinu konture diobenog vretena i b) duljinu „ogrlice“ koju čine kinetohore. Mikrotubuli diobenog vretena prikazani su zelenom bojom, a kinetohore ljubičastom.

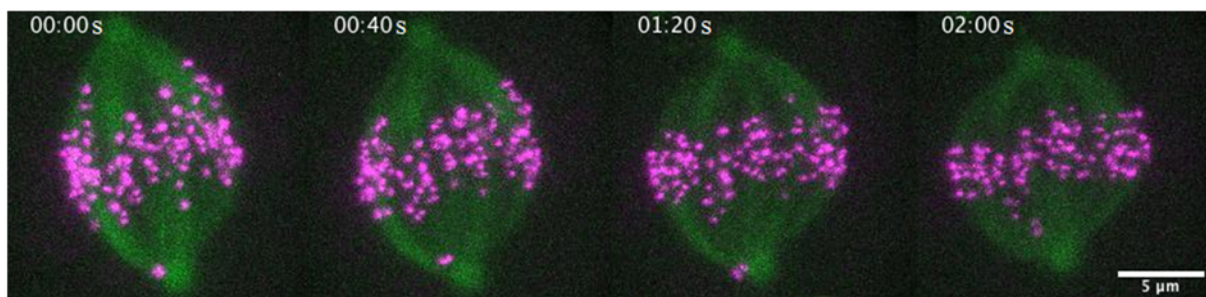
Kao što se može vidjeti na slici 9. i 10., u programu ImageJ podešeno je da mikrotubuli diobenog vretena budu prikazani zelenom bojom, a kinetohore ljubičastom. Na ovaj način su prikazi stanica usklađeni s klasičnim prikazima koji se mogu vidjeti u Literaturnom pregledu.

4. Rezultati i rasprava

U ovom poglavlju prikazani su rezultati dobiveni analiziranjem stanica U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) koje su snimane laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom i „Swept-field“ konfokalnim mikroskopom. Mikroskopske snimke su analizirane u programu ImageJ, a dobiveni podaci su grafički prikazani u programu MATLAB. Određivane su veličine koje su vezane uz oblik i izgled prometafaznih diobenih vretena. Tako su mjerene duljine i širine ovih staničnih struktura te pripadne duljine kontura i „ogrlica“ koje čine nizovi kinetohora.

4.1. Duljine i širine prometafaznih diobenih vretena

Prometafazna diobena vretena, koja su prepoznata prema obliku i položaju kinetohora, snimana su laserskim pretražnim konfokalnim mikroskopom. Snimano je 15 ravnina svakih 5 sekundi s razmakom između ravnina od 0.5 μm . Vizualni prikaz promjene duljine i širine diobenog vretena jedne reprezentativne stanice dan je na slici 13.

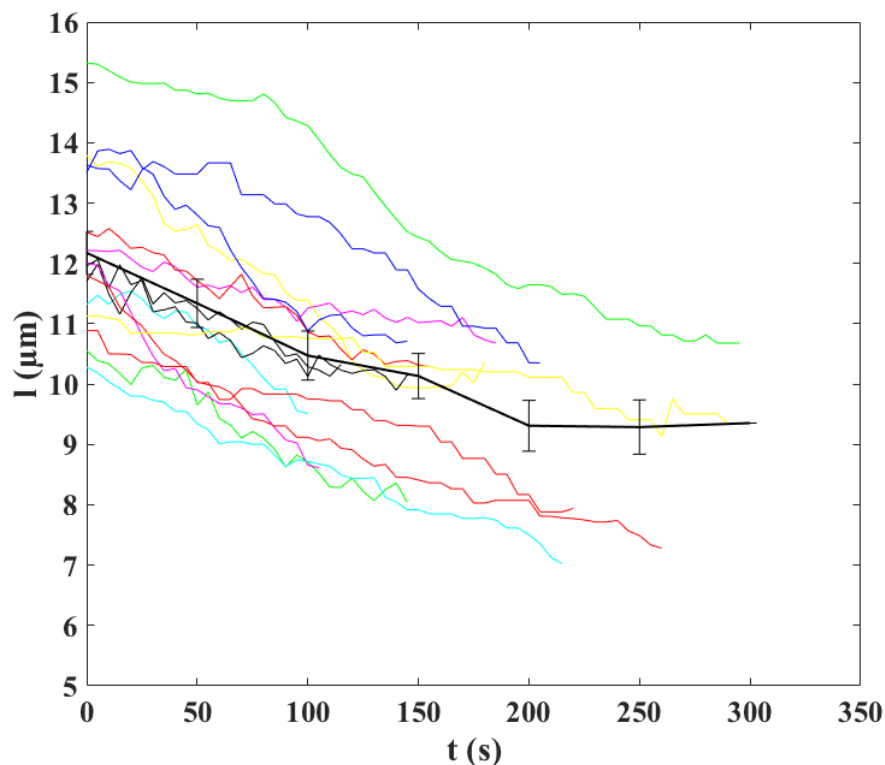


Slika 13. Prikaz promjene duljine i širine diobenog vretena U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanice u prometafazi. $\Delta T = 5$ s, $Z = 15$, $\Delta Z = 0.5$ μm . Vrijeme na slici dano je u sekundama. (Stanicu je snimio dr. sc. Juraj Simunić.)

Na slici 13 jasno je vidljivo smanjenje duljine i povećanje širine diobenog vretena. Za analizu je odabrano 15 snimljenih stanica, a trajanje duljine snimanja pojedinih stanica se razlikuje. Ovisno o jačini laserskog zračenja i broju ravnina u fluorescencijskoj mikroskopiji pojavljuje se efekt nazvan fotoizbljeđivanje (engl. *photobleaching*). Taj efekt podrazumijeva

postupno smanjenje intenziteta fluorescencije izazvano degradacijom fluorofora.⁵⁴ Pojava ovog efekta ograničava duljinu trajanja snimanja. Tako se na slici 13 može primijetiti slabiji intenzitet fluorescencije kod diobenog vretena koje je snimano 2 minute na opisani način.

U programu ImageJ izmjereno je kako su se mijenjale duljine diobenih vretena u vremenu za 15 različitih U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica. Grafički prikaz promjena duljina diobenih vretena u vremenu prikazan je na slici 14.



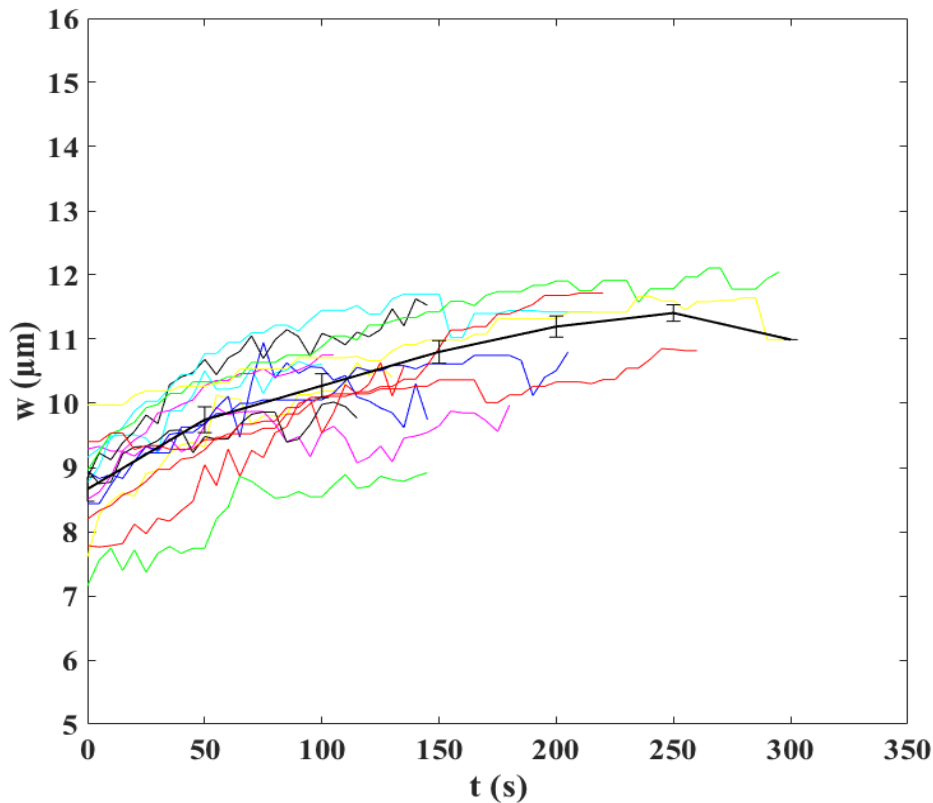
Slika 14. Prikaz ovisnosti duljina diobenih vretena, l (μm), U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaka stanica prikazana je drugom bojom ($n = 15$) $\Delta T = 5$ s, $Z = 15$, $\Delta Z = 0.5$ μm . (Analizirane stanice je snimio dr. sc. Juraj Simunić.)

Kao što se vidi iz grafičkog prikaza, duljina diobenih vretena se smanjuje u vremenu. Ova pravilnost vrijedi za svih 15 snimljenih stanica. Izračunata je prosječna duljina prometaznog diobenog vretena u vremenu $t = 0$ s i dobivena je vrijednost $12,2 \pm 1,33$ μm . Ova vrijednost odgovara vrijednosti koja se može pronaći u literaturi.⁵⁵ Vrijeme $t = 0$ s odgovara trenutku početka snimanja diobenih vretena koja prepoznamo kao prometazna, a duljina trajanja ovisi o fotoizbljeđivanju stanice prilikom snimanja. Budući da su duljine diobenih vretena određenog broja stanica nakon tri minute snimanja puno manje od

literaturno dostupnih duljina⁵⁵, može se zaključiti da je kod stanica došlo do fotooštećenja (engl. *photodamage*).⁵⁴ Kako bi došlo do fluorescencije, potrebno je pobuditi fluorofore fluorescentnih proteina. Budući da molekule koje fluoresciraju gube dio energije neradijativnim putem, emitirano zračenje imat će manju energiju u odnosu na apsorbirano zračenje.^{56, 57} Energija koja je potrebna za pobudu fluorofora ima u određenoj mjeri štetne učinke na žive stanice što nazivamo fotooštećenjem. Štetni učinci su posljedica stvaranja reaktivnih spojeva, kao što su slobodni radikali kisika koji oštećuju pojedine dijelove stanice.⁵⁴ Ovaj efekt se može umanjiti promjenom postavki snimanja. Tako se primjerice može povećati period između snimanja i smanjiti broj ravnina, a rezultati dobiveni na taj način će biti prikazani u poglavlju 4.3.

Dakle, grafički prikaz na slici 14 pokazuje da kod svih promatranih stanica dolazi do smanjenja duljine diobenog vretena, ali ne može se pouzdano reći kolika je promjena zbog fotooštećenja stanica. Problem ovakvog snimanja je i činjenica da u periodu mitoze u kojem su ova diobena vretena snimana ne postoji kontrolna točka koja bi mogla poslužiti kao referentna točka prema kojoj bi se mogle posložiti sve stanice. Tako su ove stanice snimane u različitim periodima mitoze, točnije od trenutka kad su primjećena prometafazna diobena vretena do trenutka kad je zbog pojave fotoizbljeđenja snimanje zaustavljeno. Prema tome, osim što je za detaljniju analizu promjena duljina prometafaznih vretena bilo potrebno smanjiti fotooštećenje, trebalo je još i produljiti trajanje snimanja kako bi se zahvatile kontrolne točke mitoze (pucanje jezgrine ovojnice i početak anafaze).⁶

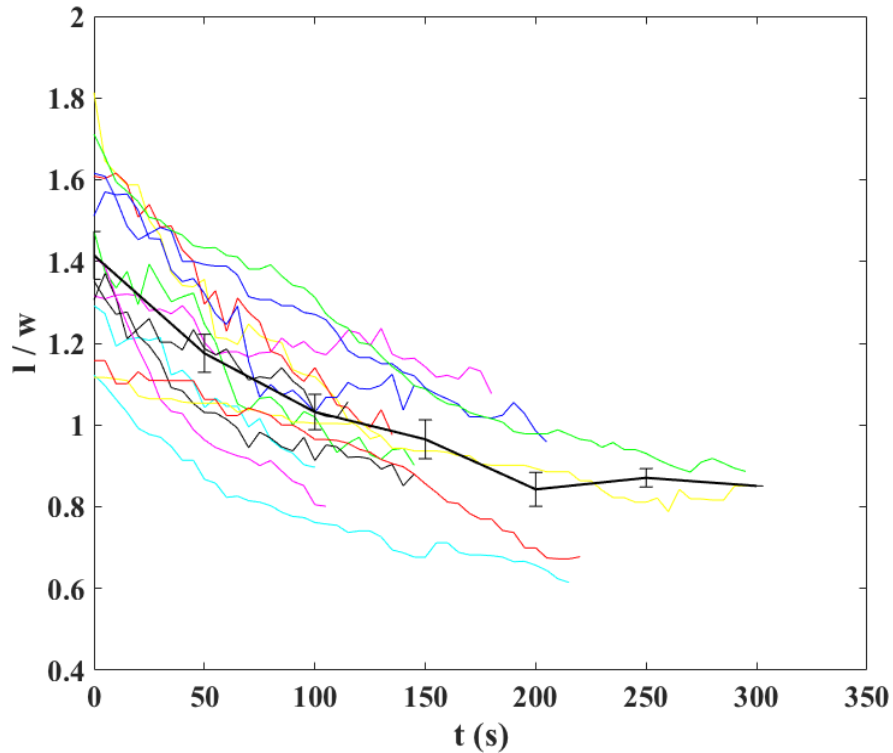
Analogno mjerenju duljina, mjerene su širine diobenih vretena prometafaznih stanica. Analiza je napravljena na istom setu U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica. Dobiveni grafički prikaz promjena širina diobenih vretena u vremenu dan je na slici 15.



Slika 15. Prikaz ovisnosti širina diobenih vretena, w (μm), U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaka stanica prikazana je drugom bojom ($n = 15$) $\Delta T = 5$ s, $Z = 15$, $\Delta Z = 0.5$ μm . (Analizirane stanice je snimio dr. sc. Juraj Simunić.)

Slika 15 pokazuje porast širine svih prometafaznih diobenih vretena u vremenu. Ova pravilnost, ponovno kao i kod mjerenja duljina diobenih vretena, vrijedi za svih 15 snimljenih stanica. Izračunata je prosječna širina prometafaznog diobenog vretena u vremenu $t = 0$ s i dobivena je vrijednost $8,6 \pm 0,7$ μm . Izmjerena vrijednost širine prometafaznog diobenog vretena nešto je niža od vrijednost koja se može pronaći u literaturi.⁵⁵ Svi nedostaci ovih rezultata analogni su navedenim nedostacima kod određivanja duljina diobenih vretena. Zbog fotoizbljeđenja, fotooštećenja i nepostojanja kontrolne točke u ovom dijelu mitoze, potrebno je podesiti parametre snimanja. Na taj će način biti dobiveni informativniji rezultati o širinama diobenih vretena u mitozu.

Za ovih 15 U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica određena je ovisnost omjera duljine i širine diobenog vretena o vremenu. Navedena ovisnost prikazana je na slici 16.

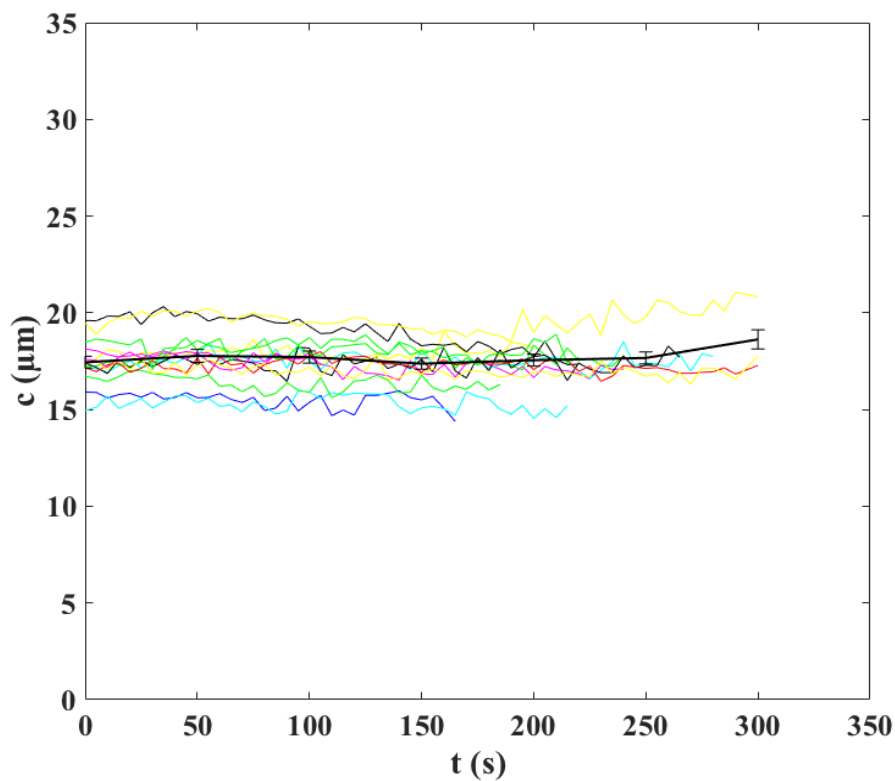


Slika 16. Prikaz ovisnosti omjera duljina, l (μm), i širina, w (μm), diobenih vretena U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaki omjer navedenih veličina prikazan je drugom bojom ($n = 15$). $\Delta T = 5$ s, $Z = 15$, $\Delta Z = 0.5$ μm . (Analizirane stanice je snimio dr. sc. Juraj Simunić.)

Iz slike 16 koja pokazuje ovisnost omjera duljina i širina diobenih vretena o vremenu može se vidjeti da je promjena duljine puno izraženija od promjene širine diobenog vretena u prometafazi. Za vrijeme $t = 0$ s ovaj omjer iznosi $1,4 \pm 0,2$.

4.2. Mjerenje konture i duljine „ogrlice“ diobenog vretena

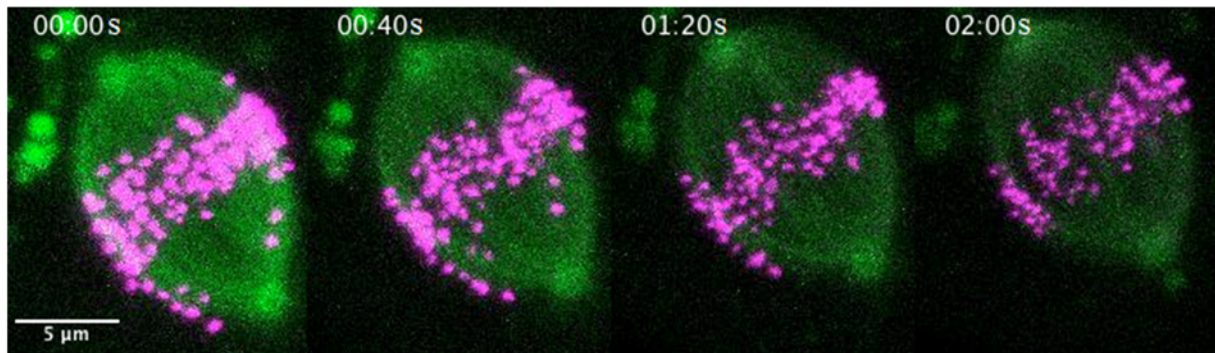
U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanicama kojima je određivana duljina i širina diobenog vretena mjerena je kontura. Kod prometafaznih stanica primjećeno je da se duljine kontura na istom diobenom vretenu razlikuju. Posljedica tog je specifičan oblik diobenih vretena u ovoj fazi mitoze. Tako prometafazna diobena vretena ne samo da su duža od metafaznih, već imaju i drugačiji oblik. Kod prometafaznih diobenih vretena jedna je kontura naglašenija, a u metafaznim stanicama diobeno vreteno gotovo poprma pravilan, simetričan oblik. U ovoj analizi mjerena je duljina izraženije konture prometafaznih diobenih vretena. Korištenjem segmentirane linije u programu ImageJ dobiveni su podaci o duljinama kontura prometafaznih diobenih vretena. Podaci su obrađeni i grafički prikazani pomoću programa MATLAB, a rezultat je prikazan na slici 17.



Slika 17. Prikaz ovisnosti duljina kontura diobenih vretena, c (μm), U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaka stanica prikazana je drugom bojom ($n = 15$). $\Delta T = 5$ s, $Z = 15$, $\Delta Z = 0.5$ μm . (Analizirane stanice je snimio dr. sc. Juraj Simunić.)

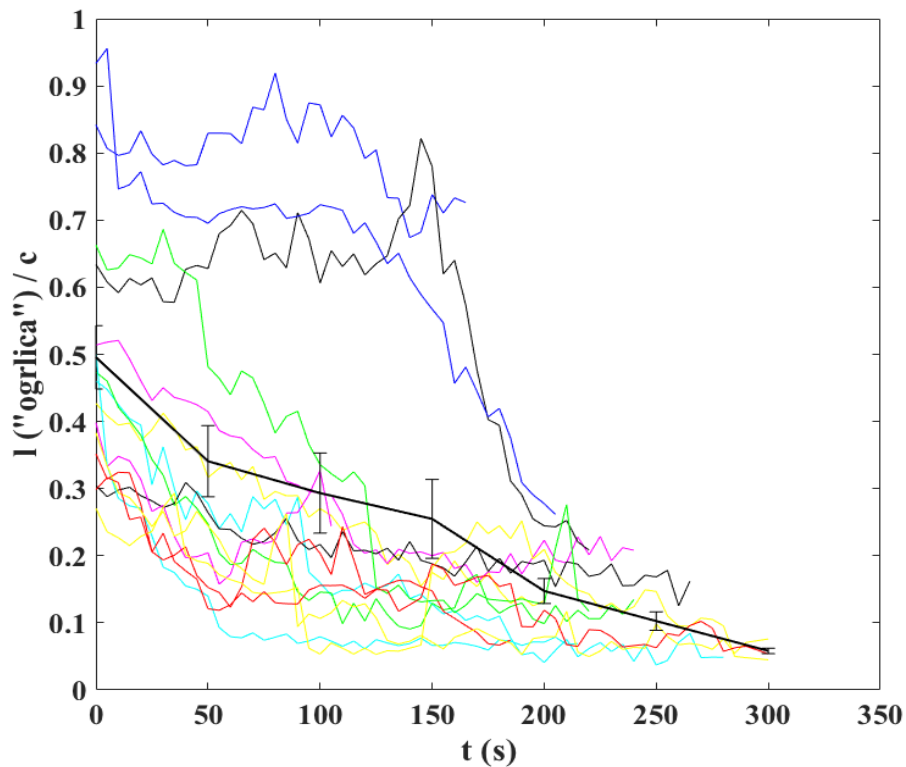
Mjerenjem kontura diobenih vretena U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica dobiven je vrlo zanimljiv rezultat. Naime, unatoč smanjenju duljina i povećanju širina diobenih vretena duljina kontura ostaje nepromijenjena. U vremenu $t = 0$ s duljina iznosi $17,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$, a ta se vrijednost kroz cijelo snimanje gotovo uopće nije promijenila. Može se zaključiti da je promjena oblika diobenog vretena posljedica sila koje djeluju na njega. Što izaziva ovu promjenu oblika tek je potrebno pokazati.

Posljednja mjerena veličina na ovom skupu U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica je duljina „ogrlice“. „Ogrlicu“ čine kinetohore poredane u nizu na vanjskom snopu mikrotubula. Kinetohore su poredane u niz na onom snopu mikrotubula na na kojem je mjerena i duljina konture. Dakle, na izraženijoj konturi mjerena je i duljina niza kinetohora. Prikaz promjene duljine kinetohorne „ogrlice“ u vremenu prikazan je na slici 18.



Slika 18. Prikaz promjene duljine „ogrlice“ koju čine kinetohore U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanice u prometafazi. $\Delta T = 5$ s, $Z = 15$, $\Delta Z = 0.5 \mu\text{m}$. Vrijeme na slici dano je u sekundama. (Stanicu je snimio dr. sc. Juraj Simunić.)

Iz vizualnog prikaza na slici 18 može se vidjeti kako se „ogrlica“ koju čine kinetohore u vremenu smanjuje. Kao što je već objašnjeno, segmentiranom linijom u programu ImageJ određene su duljine ovih kinetohora poredanih u niz. U programu MATLAB napravljen je grafički prikaz koji pokazuje kako se omjer duljine „ogrlice“ i duljine konture mijenja u vremenu, a dobiveni rezultat je prikazan na slici 19.



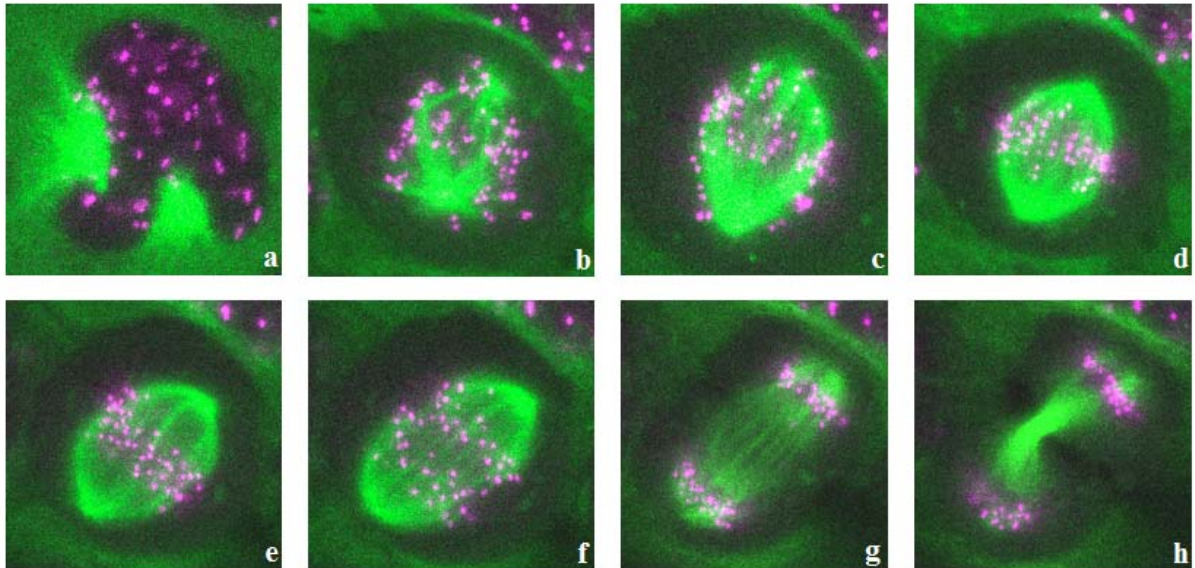
Slika 19. Prikaz ovisnosti omjera duljina „ogrlica“, l „ogrlica“ (μm), i pripadnih kontura, c (μm), diobenih vretena U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaka stanica prikazana je drugom bojom ($n = 15$). $\Delta T = 5$ s, $Z = 15$, $\Delta Z = 0.5$ μm . (Analizirane stanice je snimio dr. sc. Juraj Simunić.)

Iz prikaza na slici 19 je jasno vidljivo kako se duljina „ogrlica“ smanjuje u vremenu. U vremenu $t = 0$ s srednja vrijednost omjera duljine „ogrlice“ i duljine konture iznosi $0,49 \pm 0,18$. U literaturnom pregledu ovog rada navedeni su mogući scenariji povezivanja kinetohora s kinetohornim vlaknima. Daljnja istraživanja na ovom području će pokazati na koji način točno dolazi do povezivanja kinetohora s mikrotubulima diobenog vretena i kako kinetohore poredane na vanjskom snopu mikrotubula, koje čine „ogrlicu“, dođu u ekvatorijalnu ravninu do metafaze.

4.3. Modificirani eksperimenti

Kod rezultata koji su do sad prikazani navedeno je nekoliko problema koji su posljedica odabranih parametara snimanja. Dakle, iduće eksperimente trebalo je kreirati tako da se snimane stanice oštećuju što manje, a da se pritom dobije što je moguće više informacija o prometafaznom diobenom vretenu. Zato su pomoću „Swept-field“ konfokalnog mikroskopa snimane samo 3 ravnine. Kao što je navedeno u poglavlju Materijali i metode, povećan je i razmak između snimanih ravnina. Tako više nije snimano svakih 0.5 μm , već je razmak između ravnina postavljen na 1 μm . Ovim većim razmakom između snimanih ravnina gubi se nešto informacija o položaju svih kinetohora jer više nije prekriveno cijelo područje diobenog vretena. Međutim, taj podatak nije toliko bitan budući da su mjerene veličine vezane uz sam oblik diobenog vretena. Osim promjene broja snimanih ravnina i udaljenosti među istima, promijenjen je i vremenski period između snimanja odabranih ravnina. Tako su stanice prema novim postavkama snimane svakih 60 sekundi. Još je promijenjena i izlazna apertura. Umjesto točkaste izlazne aperture odabrani su prorezi od 35 μm . To je jedna od karakteristika „Swept-field“ konfokalnog mikroskopa Opterra I koja ga razlikuje od laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa korištenog pri snimanju do sada opisanih stanica. Odabirom proreza propušta se veća količina svjetla na uzorak, a to je omogućilo smanjenje jačine laserskog zračenja pri snimanju stanica. Odabir ove izlazne aperture bitno je produžio trajanje snimanja. Tako je s ovim postavkama bilo moguće snimanje cijele diobe stanice, a to znači da su obuhvaćene i kontrolne točke mitoze – puknuće jezgrine ovojnice i početak anafaze.

Na slici 20 prikazane su razne faze cijele diobe stanice snimane na opisan način. Odabrana je jedna tipična U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica u svakoj od faza diobe.

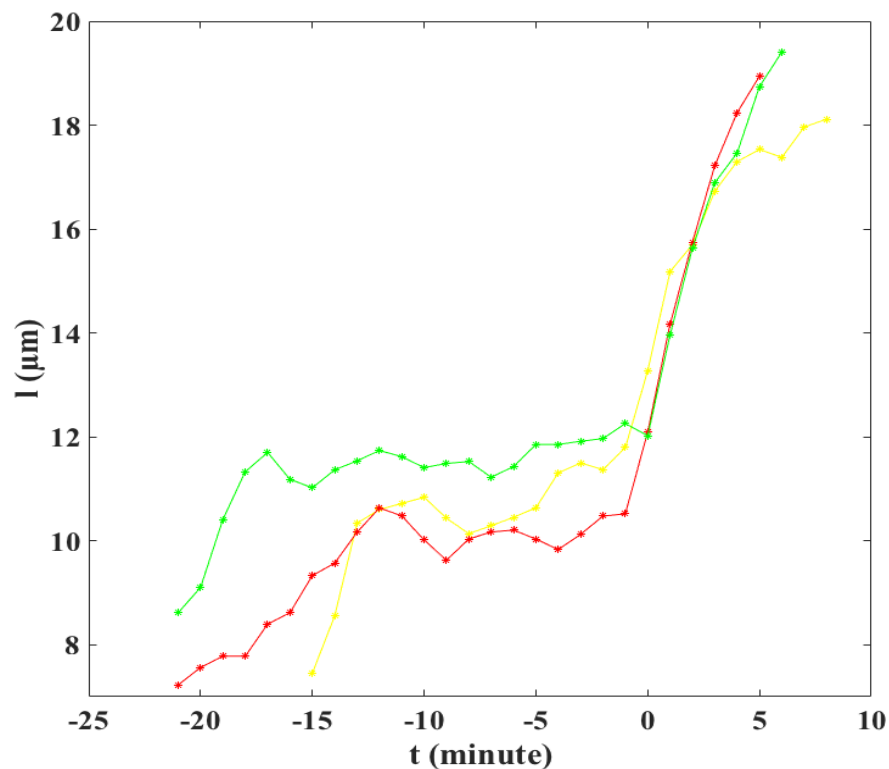


Slika 20. Prikaz faza diobe na primjeru U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanice: a) profaza stanične diobe u kojoj još nije došlo do pucanja jezgrine ovojnice, b) i c) prikaz prometafaze u kojoj nastaje diobeno vreteno i kinetohore se vežu na mikrotubule novonastale strukture, d) metafaza stanične diobe u kojoj se kinetohore nalaze u ekvatorijalnoj ravnini, e) početak anafaze, f) anafaza u kojoj djelovanjem motornih proteina i depolimerizacijom mikrotubula dolazi do povlačenja kromatida prema suprotnim polovima diobenog vretena, g) telofaza u kojoj dolazi do dekondenzacije kromosoma, ponovno nastaje jezgrina ovojnica i razgrađuje se diobeno vreteno, h) citokineza koja označava kraj diobe stanice.

S navedenim postavkama i snimanjem svakih 60 sekundi, dioba snimljenih stanica trajala je od 35 minuta do 65 minuta. Prema literaturnim podacima ovaj proces traje oko 60 minuta.^{1,3}

4.3.1. T60

Snimanjem pri kojem je vremenski interval bio 60 sekundi ($\Delta T = 60$ s) snimano je 26 stanica. Od tih stanica na slici 21 prikazane su samo 3. Budući da su snimane žive stanice i odabrane samo 3 ravnine, a napomenuto je da je mitozu trajala od 35 minuta do 65 minuta, velik broj stanica se tijekom tako dugog snimanja pomakne iz odabranih ravnina snimanja. Takve stanice ne mogu poslužiti za ovu analizu. Do velikog micanja vrlo često dođe nakon puknuća jezgrine ovojnice. U tom trenutku počinje nastajati diobeno vreteno i dolazi do velikih promjena u stanici. Stanica poprima oblik kugle i odljepljuje se od stakalca posudice za mikroskopiranje. Kako su sve ove stanice snimane neposredno prije ili nakon puknuća jezgrine ovojnice, nije čudno da ih većina izađe iz snimanih ravnina.

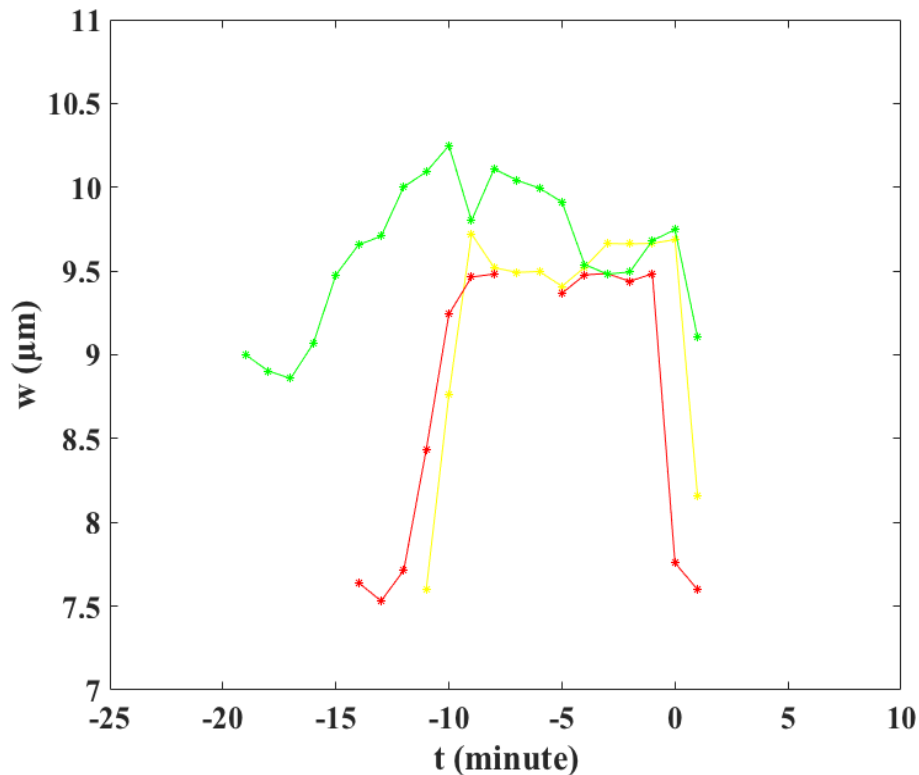


Slika 21. Prikaz ovisnosti duljina diobenih vretena, l (μm), U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaka stanica prikazana je drugom bojom ($n = 3$) $\Delta T = 60$ s, $Z = 3$, $\Delta Z = 1$ μm .

Kao $t = 0$ minuta odabran je trenutak kad stanice ulaze u anafazu i prema tom događaju su posloženi podaci za duljine diobenih vretena. Kao i kod kratkih snimaka stanica snimanih na laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopu, vidljivo je smanjenje duljine

diobenih vretena prometafaznih stanica. Za stanicu označenu zelenom bojom to je period od -17 minuta do -15 minuta, kod stanice označene žutom bojom promatramo period od -10 minuta do -7 minuta, a kod crvenom bojom označene stanice vremenski interval od -13 minuta do -10 minuta. Dakle, prometafazno skraćivanje diobenog vretena traje 2-3 minute. Linije koje označavaju prometafaznu promjenu duljine diobenog vretena se ne nalaze na istim vremenima zbog razlika u trajanju metafaze. Metafaza na grafičkom prikazu predstavlja ustaljeno stanje između prometafaznog smanjenja duljine diobenog vretena i početka anafaze, u kojem ne dolazi do bitnih promjena u duljini diobenog vretena. Ove razlike u trajanju duljine metafaze mogu biti posljedica različitog broja kromosoma tumorskih staničnih linija. Potrebno je komentirati i iznos duljina ovih prometafaznih diobenih vretena. Za stanicu označenu zelenom bojom maksimalna duljina prometafaznog diobenog vretena iznosi 11,7 μm , za stanicu označenu žutom bojom 10,8 μm i za stanicu označenu crvenom bojom 10,6 μm . Od ovih rezultata samo duljina prometafaznog diobenog vretena zeleno obilježene stanice odgovara vrijednosti dobivenoj u prethodnim pokusima. Budući da su ove stanice snimane u periodu oko puknuća jezgrine ovojnice, ne utječe se na odabir kao što je slučaj kod odabira u prometafazi. Tako je kod stanica koje se snimaju od trenutka kad je prepoznato prometafazno diobeno vreteno moguće sustavno uzimanje većih struktura.

Slika 22 prikazuje promjene širina diobenih vretena kod ovih istih stanica. I pritom je ponovno ulazak u anafazu uzet kao referentna točka.

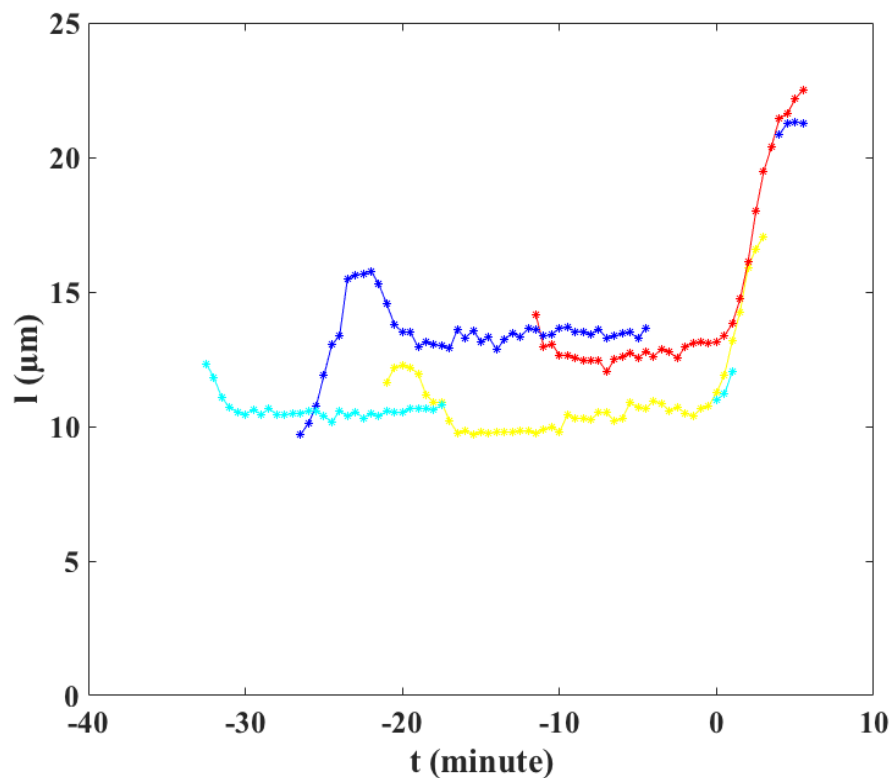


Slika 22. Prikaz ovisnosti širina diobenih vretena, w (μm), U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaka stanica prikazana je drugom bojom ($n = 3$) $\Delta T = 60$ s, $Z = 3$, $\Delta Z = 1$ μm .

Za stanicu označenu zelenom bojom ponovno se promatra period od -17 minuta do -15 minuta i u tom se periodu očekivano vidi porast širine diobenog vretena. Stanicu označenu žutom bojom promatramo u vremenskom intervalu od -10 minuta do -7 minuta. Za ovu stanicu u tom periodu možemo vidjeti veliki porast u širini diobenog vretena. U ovom slučaju se radi o puno većoj promjeni u širini diobenog vretena od promjena širine opaženih kod prošlih eksperimenata. Kod stanice označene žutom bojom praćen je period od -13 minuta do -10 minuta i u tom periodu se također širina diobenog vretena povećava. Za stanicu označenu zelenom bojom širina metafaznog diobenih vretena iznosi 9,6 μm , za stanicu označenu žutom bojom 9,7 μm i za stanicu označenu crvenom bojom 9,5 μm . U literaturi je pronađena vrijednost za širinu metafaznih U2OS stanica koja iznosi $9,5 \pm 0,6$ μm .⁵⁵ Ovo poklapanje je još jedna potvrda kako je na ovaj način snimanja izbjegnuto fotooštećenje stanica čija je posljedica nepravilna dioba stanica. Pripadne prometafazne širine su 8,9 μm , 8,8 μm i 7,7 μm .

4.3.2. T30

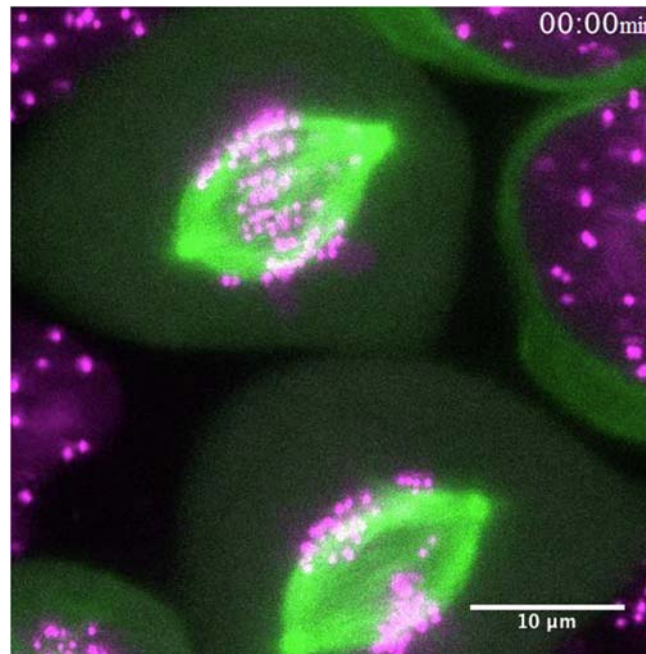
Jednako kao što su snimane stanice svakih 60 sekundi, snimano je i 48 stanica svakih 30 sekundi. Duplo kraće vrijeme snimanja znači duplo više podataka o veličinama u prometafazi. To je bio logičan korak jer kod grafičkih prikaza stanica snimanih svakih 60 sekundi samo 3-4 točke odgovaraju događajima u prometafazi. Od 48 snimanih stanica, samo 4 stanice je bilo moguće analizirati. Duljine diobenih vretena analiziranih stanica snimanih svakih 30 sekundi prikazane su na slici 23.



Slika 23. Prikaz ovisnosti duljina diobenih vretena, l (μm), U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaka stanica prikazana je drugom bojom ($n = 3$). $\Delta T = 30$ s, $Z = 3$, $\Delta Z = 1$ μm .

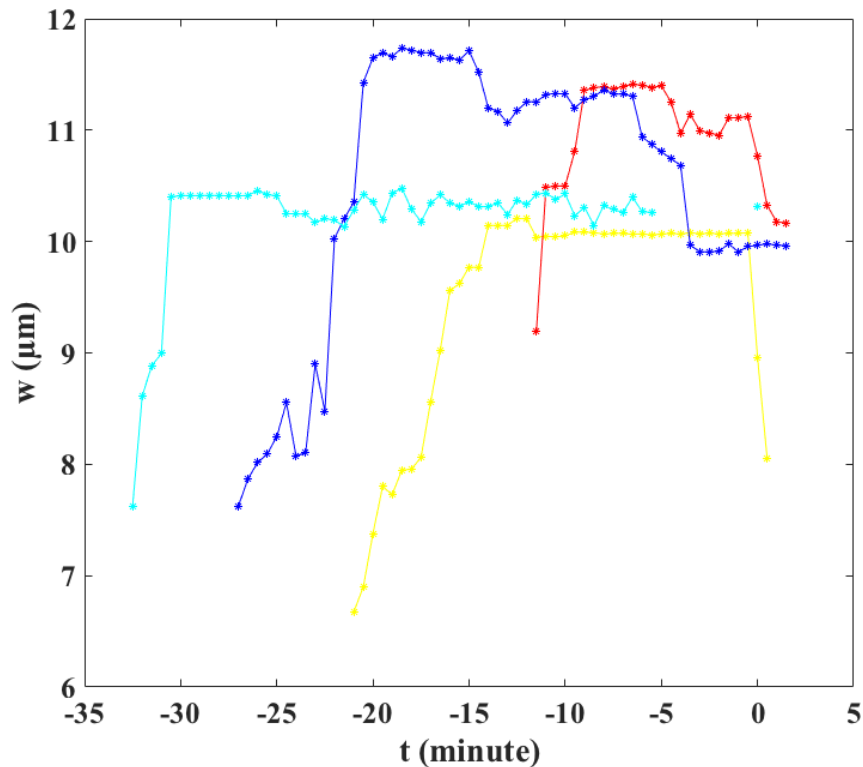
Na slici 23 može se uočiti vrlo sličan oblik krivulje koja pokazuje kako su se mijenjale duljine diobenog vretena do anafaze. Trenutak kad stanice ulaze u anafazu ponovno je odabran kao točka prema kojoj su usklađene sve stanice, a označen je s $t = 0$ minuta. Stanice označene crvenom, tirkiznom i žutom bojom snimane su tek od trenutka kad je diobeno vreteno prepoznato kao prometafazno. Samo plava stanica je snimana neposredno nakon puknuća jezgrine ovojnice. Sve ostale stanice koje su snimane prije ili neposredno nakon puknuća jezgrine ovojnice nisu mogle ući u anafazu ili im je za to bilo potrebno približno 2

sata, što je značilo da dioba nije ispravna. Velike razlike u trajanju metafaze ukazuju da je potrebno i ove rezultate uzeti s oprezom. Prometafazna diobena vretena stanica koje su označene crvenom, tirkiznom i žutom bojom duga su 14,2 μm , 13,1 μm i 12,3 μm . Ove vrijednosti su vrlo slične vrijednostima koje su dobivene za 15 stanica kod kojih su diobena vretena birana prema obliku i položaju kinetohora. Primjer odabranih stanica prikazan je na slici 24, a od dvije paralelno snimane stanice samo je stanicu koja je na slici gore bilo moguće analizirati. Stanica dolje je tijekom snimanja izašla iz promatranog područja. Analizirana stanica je na grafičkom prikazu ovisnosti duljine diobenog vretena o vremenu prikazana crvenom bojom.



Slika 24. Primjer odabranih prometafaznih diobenih vretena U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica. $\Delta T = 30$ s, $Z = 3$, $\Delta Z = 1$ μm .

Nakon što je na slici 23 prikazano kako se duljina diobenog vretena mijenja u vremenu, na slici 25 je predočeno kako se ponašaju širine prometfaznih diobenih vretena za ove 4 stanice.



Slika 25. Prikaz ovisnosti širina diobenih vretena, w (μm), U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica o vremenu, t (s). Svaka stanica prikazana je drugom bojom ($n = 4$). $\Delta T = 30$ s, $Z = 3$, $\Delta Z = 1$ μm .

Iz grafičkog prikaza ovisnosti širina diobenih vretena o vremenu jasno je ponovno vidljiv porast u periodu koji odgovara prometafazi. Širine metafaznih diobenih vretena većih su vrijednosti od onih koje su dobivene kad su stanice snimane svakih 60 sekundi. Za stanicu označenu crvenom bojom ta je vrijednost 11,3 μm , za stanicu označenu tirkiznom bojom 10,2 μm , a za stanicu označenu žutom bojom 10,1 μm .

Potrebno je još napomenuti kako su na malenom broju stanica isprobane razne modifikacije ovih postavki. Tako je isprobano snimanje 4 ravnine ($n = 5$), snimanje svakih 45 sekundi ($n = 4$) i snimanje pri kojem je prvih 10 minuta snimano svakih 30 sekundi, a potom do kraja snimanja svakih 60 sekundi ($n = 12$). Pri snimanju 4 ravnine zbog fotoizbljeđenja stanica nije bilo moguće snimanje do anafaze, a pri snimanju svakih 45 sekundi i pri

kombiniranom snimanju javljali su se isti problemi koji su opisani kod stanica koje su snimane svakih 30 sekundi.

5. Zaključak

Analizom U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica snimljenih laserskim pretražnim mikroskopom dobiveno je da je za svih 15 snimljenih stanica došlo do smanjivanja duljine prometafaznog diobenog vretena u vremenu. Također, pokazano je i da pritom dolazi do povećanja širine diobenog vretena. Iz prikaza omjera duljine i širine diobenog vretena u vremenu, pokazano je da je promjena duljine izraženija od promjene širine. Određena je prosječna duljina prometafaznog diobenog vretena i iznosi $12,2 \pm 1,33 \mu\text{m}$. Prosječna širina diobenog vretena u ovoj fazi mitoze iznosi $8,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$, a omjer duljine i širine diobenog vretena je $1,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$.

Analizom kontura primijećeno je da nema bitnih promjena u duljini istih, a prosječna duljina konture je $17,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$. Također, određena je i srednja vrijednost omjera duljine „ogrlice“ i pripadne konture, a iznosi $0,49 \pm 0,18$.

Analizom U2OS (CENP-A-GFP, mCherry- α -tubulin) stanica snimanih „Swept-field“ konfokalnim mikroskopom određeno je da dioba stanica traje od 35 minuta do 65 minuta. Snimanjem stanica svakih 60 sekundi određeno je da prometafazno skraćivanje diobenog vretena traje 2-3 minute. Vrijednosti duljina prometafaznih diobenih vretena za 3 analizirane stanice iznose $11,7 \mu\text{m}$, $10,8 \mu\text{m}$ i $10,6 \mu\text{m}$. Pripadne širine su $8,9 \mu\text{m}$, $8,8 \mu\text{m}$ i $7,7 \mu\text{m}$. Širine ovih diobenih vretena u metafazi iznose $9,6 \mu\text{m}$, $9,7 \mu\text{m}$ i $9,5 \mu\text{m}$. Za stanice koje su snimane svakih 30 sekundi, vrijednosti duljine prometafaznog diobenog vretena iznose $14,2 \mu\text{m}$, $13,1 \mu\text{m}$ i $12,3 \mu\text{m}$, dok su širine $9,2 \mu\text{m}$, $8,3 \mu\text{m}$ i $7,4 \mu\text{m}$.

Mjerenjem ovih veličina dobivene su osnovne informacije o diobenom vretenu u prometafazi. U daljnjim istraživanjima potrebno je provjeriti signifikantnost ovih rezultata usporedbom s vrijednostima dobivenim za veći broj stanica. Također, potrebno je odgovoriti na pitanje na koji način dolazi do povezivanja kinetohora s mikrotubulima diobenog vretena te kako kinetohore, poredane na vanjskom snopu mikrotubula, dođu u ekvatorijalnu ravninu do metafaze stanične diobe.

6. Literatura

1. G. M. Cooper, *The Cell: A molecular approach*, 2nd edition, Boston University Sinauer Associates (2000)
2. A. R. Cuddihy, M. J. O'Connell, *Int. Rev. Cytol.*, **222** (2003) 99-140.
3. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th edition, New York, W. H. Freeman (2000)
4. U. Galderisi, F. P. Jori, A. Giordano, *Oncogene*, **22** (2003) 5208-5219.
5. P. K. Jackson, *Cell*, **134** (2008) 199-202.
6. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 6th edition, New York, Garland Science (2014)
7. F. Shang, A. Taylor, *Free Radical Bio. Med.*, **51** (2011) 5-16.
8. H. C. Vodermaier, *Curr. Biol.*, **14** (2004) 787-796.
9. J. R. McIntosh, M. I. Molodtsov, F. I. Ataullakhanov, *Q. Rev. Biophys.*, **45** (2012) 147-207.
10. J. Beaudouin, D. Gerlich, N. Daigle, R. Eils, J. Ellenberg, *Cell*, **108** (2002) 83-96.
11. D. Lu, J. Y. Hsiao, N. E. Davey, V. A. van Voorthis, S. A. Foster, C. Tang, D. O. Morgan, *J. Cell. Biol.* **207** (2014) 23-39.
12. F. Stegmeier, A. Amon, *Annu. Rev. Genet.*, **38** (2004) 203-232.
13. A. L. Miller, *Curr. Biol.*, **21** (2011) 976-978.
14. N. Pavin, I. M. Tolić, *Annu. Rev. Biophys.*, **45** (2016) 279-298.
15. E. A. Nigg, T. Stearns, *Nat. Cell. Biol.*, **13** (2011) 1154-1160.
16. E. N. Firat – Karalat, T. Stearns, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **369** (2014) 1-10.
17. V. van Buren, L. Cassimeris, D. J. Odde, *Biophys. J.*, **89** (2005) 2911-2926.
18. T. Mitchison, M. Kirschner, *Nature*, **312** (1984) 237-242.
19. H. Maiato, P. Sampaio, C. E. Sunkel, *Int. Rev. Cytol.*, **241** (2004) 53-153.
20. J. Kajtez, A. Solomatina, M. Novak, B. Polak, K. Vukušić, J. Rüdiger, G. Cojoc, A. Milas, I. Šumanovac Šestak, P. Risteski, F. Tavano, A. H. Klemm, E. Roscioli, J. Welburn, D. Cimini, M. Glunčić, N. Pavin, I. M. Tolić, *Nat. Commun.*, **7** (2016) 1-11.
21. D. N. Mastronarde, K. L. McDonald, R. Ding, R. McIntosh, *J. Cell. Biol.*, **123** (1993) 1475-1489.
22. C. G. Jansen, *J. Cell. Biol.*, **92** (1982) 540-558.

23. K. L. McDonald, E. T. O'Toole, D. N. Mastrorarde, J. R. McIntosh, *J. Cell. Biol.*, **118** (1992) 369-383.
24. R. Ohi, M. L. Coughlin, W. S. Lane, T. J. Mitchison, *Dev. Cell.*, **5** (2003) 309-321.
25. I. M. Tolić, N. Pavin, *Cell Cycle*, **15** (2016) 1169-1170.
26. A. Milas, I. M. Tolić, *Matters Select*, (2016)
27. K. Vukušić, R. Buđa, *Dissection of microtubule bundles in mitotic spindle using femtosecond laser ablation*, (rukopis), (2016)
28. J. Simunić, I. M. Tolić, *Trends Biochem. Sci.*, (2016)
29. P. Bieling, I. A. Telley, T. Surrey, *Cell*, **142** (2010) 420-432.
30. G. Cojoc, A. M. Florescu, A. Krull, A. H. Klemm, N. Pavin, F. Jülicher, I. M. Tolić, *Sci. Rep.*, (2016)
31. H. Tachiwana, W. Kagawa, H. Kurumizaka, *Nucleus*, **3** (2012) 6-11.
32. H. Tachiwana, W. Kagawa, T. Shiga, A. Osakabe, Y. Miya, K. Saito, Y. Hayashi – Takanaka, T. Oda, M. Sato, S. Y. Park, H. Kimura, H. Kurumizaka, *Nature*, **476** (2011) 232-235.
33. I. Kalinina, A. Nandi, P. Delivani, M. R. Chacón, A. H. Klemm, D. Ramunno – Johnson, A. Krull, B. Linder, N. Pavin, I. M. Tolić – Nørrelykke, *Nat. Cell Biol.*, **15** (2012) 82-87.
34. I. M. Cheeseman, A. Desai, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9** (2008) 33-46.
35. S. Cai, C. B. O'Connell, A. Khodjakov, C. E. Walczak, *Nat. Cell Biol.*, **11** (2009) 832-838.
36. K. W. Wood, R. Sakowicz, L. S. B. Goldstein, D. W. Cleveland, *Cell*, **91** (1997) 357-366.
37. K. M. Niforou, A. K. Anagnostopoulos, K. Vougas, C. Kittas, V. G. Gorgoulis, G. T. Tsangaris, *Cancer Genomics and Proteomics*, **5** (2008) 63-78.
38. M. Barišić, P. Aguiar, S. Geley, H. Maiato, *Nat. Cell Biol.*, **12** (2014) 1249-1256.
39. D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edition, New York, W. H. Freeman, (2004)
40. R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, **67** (1998) 509-544.
41. X. Shu, N. C. Shaner, C. A. Yarbrough, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Biochemistry*, **45** (2006) 9639-9647.
42. R. N. Day, M. W. Davidson, *Chem. Soc. Rev.*, **10** (2009) 2887-2921.
43. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu> (preuzeto: 29.8.2016.)
44. A. Milas, Fluorescentni proteini, Završni rad, (20015)
45. S. K. Balchand, B. J. Mann, P. Wadsworth, *Methods Mol. Biol.*, (2016)
46. I. Weber, *Glasilo IRB*, (2004)

47. <http://sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Formulation> (preuzeto: 25.8.2016.)
48. <http://protocolsonline.com/recipes/phosphate-buffered-saline-pbs/> (preuzeto: 25.8.2016.)
49. http://sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet (preuzeto: 25.8.2016.)
50. <http://leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/details/product/leica-tcs-sp8/> (preuzeto: 25.8.2016.)
51. <http://java.com/en/about/imagej.net/imageJ> (preuzeto: 25.8.2016.)
52. <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-19> (preuzeto: 25.8.2016.)
53. MATLAB, R2015b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, SAD
54. V. Magidson, A. Khodjakov, *Methods Cell Biol.*, (2013) 1-15.55.
55. S. Young, S. Besson, J. P. I. Welburn, *Biology Open*, (2014) 1-7.
56. D. Skoog, J. Holler, S. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Thomas Brooks/Cole, Belmont, (2007)
57. T. Cvitaš, *Fizikalna kemija* (rukopis)

7. Prilozi

7.1. Životopis

Ime i prezime: Barbara Kuzmić

Datum i mjesto rođenja: 14.5.1991., Zagreb

Obrazovanje:

2014. – 2016. Sveučilišni diplomski studij kemije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb, istraživački smjer, grane: Biokemija i Analitička kemija

2010. – 2014. Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb

2006. – 2010. Gimnazija Velika Gorica, Velika Gorica

Sudjelovanja i priznanja:

2013. 6. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2014. 7. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2015. 8. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2016. 9. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2013. Posebna Rektorova nagrada za sudjelovanje u organiziranju 6. Otvorenog dana Kemijskog odsjeka

Izvannastavna aktivnost:

2013. – danas Članica volonterskog projekta Studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva „Znanstvene čarolije“

*„...I Sunce već sramežljivo prve zrake baca,
svaka oluja žuri postati bonaca...“*

Z. Majsec