

Uloga proteina NuMa u sastavljanju i arhitekturi mitotskog diobenog vretena

Jelenić, Stela

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:280143>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Stela Jelenić

**ULOGA PROTEINA NuMA U SASTAVLJANJU I ARHITEKTURI
MITOTSKOG DIOBENOG VRETENA**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biofiziku stanice na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ive Tolić i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Majom Matulić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Najprije veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivi Tolić što mi je omogućila da budem dio njezinog iznimno uspješnog tima i naučila me koliko je u znanosti i u životu važan optimističan stav.

Veliko hvala i dr. sc. Jurju Simuniću koji me usmjeravao u izradi ovog diplomskog rada i savjetovao me tijekom mog rada u laboratoriju. Naučio me mnogo toga korisnog i zanimljivog što ću vjerujem koristiti i u svom daljnjem radu.

Iznimno sam zahvalna svim ostalim članovima Laboratorija za biofiziku stanice što su uvijek bili tu za pomoć, savijete i ugodan razgovor. Ogromno vam hvala na svemu!

Hvala profesorici Maji Matulić na pomoći i sugestijama oko ovog diplomskog rada.

Hvala svim učiteljima i profesorima kroz moje školovanje koji su me motivirali i poticali moju znatiželju.

Hvala svim mojim prijateljima koji su vrijeme studiranja učinili zabavnim i nezaboravnim. Uvijek ću pamtiti naša druženja, priče, savjetovanja, ohrabivanja i smijanja! Hvala Davidu za sve dane na Savi. Hvala Zoe što je u svakom trenutku bila prava podrška i pravi prijatelj. Hvala mome Frani što je uvijek bio tu za mene i u najljepšim trenucima i onima manje lijepima te što mi je uvijek vratio osmijeh na lice kada mi je to trebalo.

Najveće hvala mojoj obitelji: seki Ivani, mami i tati. Vi ste mi dali sve na svijetu.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga proteina NuMA u sastavljanju i arhitekturi mitotskog diobenog vretena

Stela Jelenić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Stanica tijekom mitoze stvara diobeno vreteno: dinamičnu i kompleksnu strukturu sastavljenu od mikrotubula, motornih i nemotornih proteina. Nemotorni protein NuMA (eng. *nuclear and mitotic apparatus*) tijekom mitoze je uglavnom prisutan na polovima vretena gdje sudjeluje u njihovom održavanju i u manjoj mjeri na staničnom korteksu u kompleksu s proteinom LGN gdje sudjeluje u pozicioniranju diobenog vretena unutar stanice. U ovome radu promatrana je njegova uloga u mitozu kada je utišana ekspresija proteina LGN pomoću siRNA u stanicama linije HeLa. Prilikom utišavanja došlo je do promjene arhitekture diobenog vretena i smanjenja heliciteta njegovih mikrotubula, međutim, lokalizacija proteina NuMA i polovi diobenog vretena su ostali očuvani. Također, konstruiran je optogenetički sustav za protein NuMA koji, iako se pokazao funkcionalnim, nije bio dovoljno efikasan da bi se iskoristio za detaljno određivanje njegove funkcije u metafazi mitoze. Ipak, moguće je da bi ovaj sustav bio iznimno moćan alat u drugoj staničnoj liniji ili drugoj fazi mitoze. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da protein LGN najvjerojatnije ima dodatnu funkciju tijekom mitoze vezanu uz diobeno vreteno koja vjerojatno ne ovisi o njegovoj interakciji s proteinom NuMA.

(66 stranica, 28 slika, 41 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: LGN, polovi diobenog vretena, optogenetički sustav, mitoz, metafaza

Voditelj: prof. dr. sc. Iva Tolić

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić
3. doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

The role of NuMA in mitotic spindle assembly and architecture

Stela Jelenić
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

During mitosis, the cells create a dynamic and complex structure called mitotic spindle made of microtubules, motor and crosslinking proteins. NuMA (Nuclear and Mitotic Apparatus) is a crosslinking protein which is, during mitosis, mostly present on spindle poles maintaining them and in a smaller amount on the cell cortex in complex with LGN protein which is responsible for spindle orientation. In this thesis the role of NuMA in mitosis was investigated in cells in which LGN protein expression had been silenced by siRNA in HeLa cells. The result of silencing was change in spindle architecture and decrease in the helicity of microtubule bundles, but NuMA localization and spindle poles were preserved. Furthermore, an optogenetic system for NuMA was constructed. It was shown to be functional, but not efficient enough to investigate NuMA's function in the metaphase of mitosis. Nevertheless, the constructed system could be a very powerful tool in a different cell line or in another phase of mitosis. It could be concluded that LGN protein has, beside NuMA regulation, an additional function in mitosis that is connected to the spindle and probably does not depend on interaction with NuMA.

(66 pages, 28 figures, 41 references, original in Croatian)

Keywords: LGN, spindle poles, optogenetic system, mitosis, metaphase

Supervisor: Dr. Iva Tolić, Prof.

Co-supervisor: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof

Reviewers:

1. Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.
2. Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.
3. Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Substitute: Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Mitoza kao dio staničnog ciklusa	1
1.2. Mitotsko diobeno vreteno.....	2
1.2.1. <i>Struktura i dinamika mikrotubula</i>	3
1.2.2. <i>Organizacija mikrotubula u diobenom vretenu</i>	4
1.2.3. <i>Kiralnost diobenog vretena</i>	6
1.3. Proteini u diobenom vretenu	8
1.3.1. <i>Lokalizacija i uloga proteina NuMA</i>	8
1.3.2. <i>Proteini koji sudjeluju u orijentaciji diobenog vretena</i>	10
1.4. Optogenetičke metode	13
1.4.1. <i>Optogenetički sustav iLID</i>	14
1.5. Cilj istraživanja	15
2. Materijali i metode	16
2.1. Konstrukcija plazmida.....	16
2.1.1. <i>Umnažanje željenog fragmenta lančanom reakcijom polimeraze</i>	17
2.1.2. <i>Linearizacija plazmida</i>	18
2.1.3. <i>Gel elektroforeza na agaroznom gelu i pročišćavanje produkata PCR i lineariziranih vektora</i>	19
2.1.4. <i>Reakcija kloniranja</i>	20
2.1.5. <i>Transformacija bakterija</i>	20
2.1.6. <i>Reakcija PCR s bakterijskim kolonijama kao kalupom</i>	21
2.1.7. <i>Izolacija rekombinantnog plazmida</i>	22
2.1. Stanična kultura.....	22
2.1.1. <i>Uzgoj stanica i priprema za mikroskopiranje</i>	22
2.1.8. <i>Transfekcija siRNA i plazmida</i>	23
2.1.9. <i>Tretman specifičnim inhibitorima motornog proteina Eg5</i>	23
2.2. Imunofluorescencija	24
2.3. Svjetlosna mikroskopija i aktivacija optogenetičkog sustava	25
2.3.1. <i>Postavke za snimanje živih stanica nakon utišavanja proteina LGN</i>	26
2.3.2. <i>Postavke za snimanja stanica nakon imunofluorescencije</i>	26
2.3.3. <i>Aktivacija optogenetičkog sustava</i>	26
2.4. Analiza snimaka	27

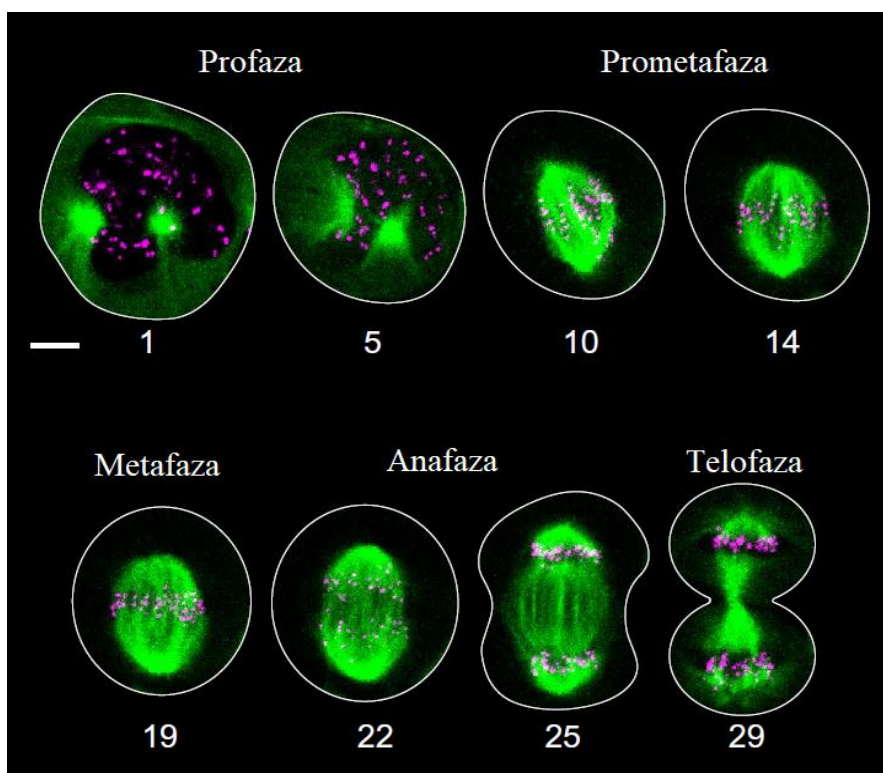
2.4.1.	<i>Određivanje heliciteta vlakana u diobenom vretenu</i>	28
2.4.2.	<i>Izrada grafičkih prikaza i statistička obrada podataka</i>	29
3.	Rezultati	31
3.1.	Utišavanje ekspresije proteina LGN pomoću siRNA	31
3.2.	Učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na diobeno vreteno u živim stanicama ..	33
3.2.1.	<i>Arhitektura diobnog vretena nakon utišavanja ekspresije proteina LGN</i>	33
3.2.2.	<i>Helicitet vlakana mikrotubula nakon utišavanja ekspresije proteina LGN</i>	36
3.3.	Učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na lokalizaciju proteina NuMA	38
3.4.	Učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na lokalizaciju proteina Eg5	41
3.5.	Djelovanje inhibitora motorne aktivnosti proteina Eg5 na lokalizaciju proteina NuMA	44
3.6.	Uspostava optogenetičkog sustava za protein NuMA	46
3.6.1.	<i>Funkcioniranje optogenetičkog sustava za protein NuMA</i>	47
3.6.2.	<i>Kontrola optogenetičkog sustava za protein NuMA</i>	51
4.	Rasprava	54
4.1.	Učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na mitotsko diobeno vreteno	54
4.2.	Djelovanje inhibitora motorne aktivnosti proteina Eg5 na lokalizaciju proteina NuMA	58
4.3.	Optogenetički sustav za protein NuMA	59
5.	Zaključak	61
6.	Literatura	62
7.	Životopis	66

1. Uvod

1.1. Mitoza kao dio staničnog ciklusa

Kontinuitet života leži u jednostavnoj činjenici: jedini način da nastane nova stanica jest taj da se postojeća stanica udvostruči. Svi živi organizmi, od bakterija do sisavaca, zapravo su produkti uzastopnih staničnih dioba kojima prethodi stanični rast. Stanice se dijele iznimno uređenim slijedom događaja koji uključuje ciklus udvostručavanja staničnog sadržaja i diobe na dvije stanice, a nazivamo ga staničnim ciklusom. Stanični ciklus eukariotskih organizama sastoji se od četiri faze: G_1 , S, G_2 i M. Tijekom faza G_1 i G_2 stanice rastu i udvostručuju masu proteina i organela dok u S fazi dolazi do duplikacije kromosoma i te tri faze zajedno čine interfazu. Preostala M faza predstavlja staničnu diobu i uključuje mitozu odnosno diobu jezgre i citokinezu odnosno diobu citoplazme (Alberts i sur. 2002).

Mitoza se tradicionalno dijeli u pet stadija. Prva je profaza u kojoj dolazi do kondenzacije sestrinskih kromatida - udvostručenih kromosoma koji ostaju asocirani te do razdvajanja repliciranih centrosoma i početka formiranja diobenog vretena. Profaza završava puknućem jezgrine ovojnice čime započinje prometafa u kojoj se kromosomi vežu za diobeno vreteno. Nakon toga slijedi metafaza u kojoj se kromosomi poravnavaju u ekvatorijalnu ravninu tj. prostor točno između polova vretena. Nakon što su svi kromosomi poravnati može doći do odvajanja sestrinskih kromatida prema suprotnim polovima što nazivamo anafazom. Posljednji stadij mitoze je telofaza u kojoj se setovi kromosoma, koji se sada nalaze na suprotnim polovima, počinju dekondezirati (Alberts i sur. 2002). Na slici 1.1. prikazane su faze mitoze snimljene konfokalnim fluorescentnim mikroskopom.



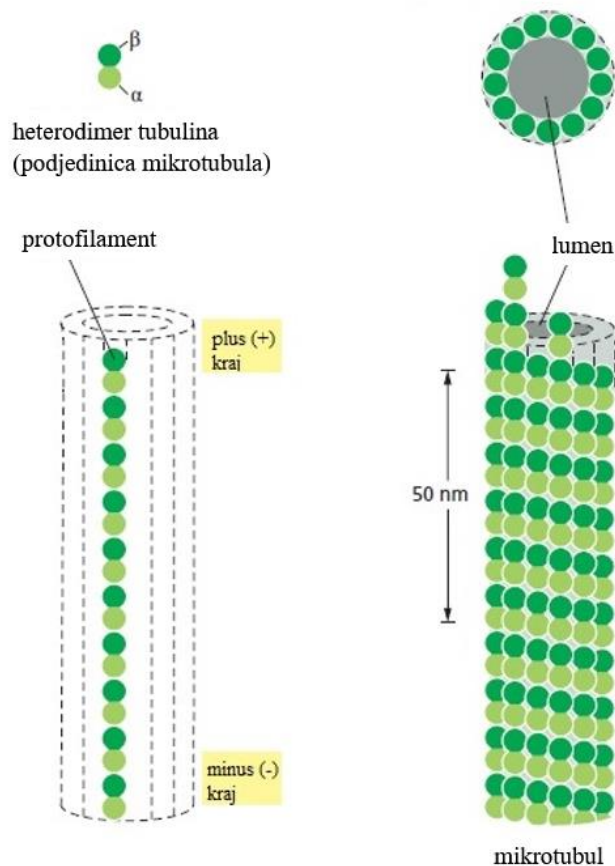
Slika 1.1. Faze mitoze u ljudskim stanicama. Mikrotubuli su prikazani zelenom bojom, a kinetohore ružičastom. Brojke predstavljaju vrijeme u minutama, a bijele linije vanjski rub stanice. Mjerilo je duljine 5 μm . Prilagođeno i preuzeto iz Tolić (2017).

1.2. Mitotsko diobeno vreteno

Tijekom mitoze, obje stanice kćeri moraju dobiti identični genetički materijal kojeg je imala majčinska stanica. Budući da viši organizmi imaju velike genome raspoređene u mnogo kromosoma, simetrična podjela genetičkog materijala je vrlo težak zadatak. Da bi ga uspješno izvršile, eukariotske stanice tijekom svake diobe grade iznimno složenu i dinamičnu strukturu koju nazivamo diobenim vretenom (Fant i sur. 2004). Ono se sastoji od mikrotubula, kromosoma i pomoćnih proteina. Vreteno ima jasno definirani oblik i karakteristični raspored mikrotubula koji se pružaju od polova vretena i međusobno interagiraju (Pavin i Tolić 2016).

1.2.1. Struktura i dinamika mikrotubula

Mikrotubuli su polimeri proteina tubulina organizirani u strukture nalik na šuplje cjevčice. Tubulin je heterodimer koji se sastoji od monomera koje nazivamo α -tubulin i β -tubulin. Oni se slažu u protofilamente uvijek u istoj orijentaciji “glava-rep” tako da se uvijek stvaraju interakcije između β -tubulina jedne podjedinice i α -tubulina sljedeće. Da bi se stvorila cjevčica, takvih se 13 protofilamenata povezuje lateralno pri čemu uvijek nastaju interakcije α -tubulina u jednom filamentu s α -tubulinom u susjednim protofilamentima (Slika 1.2.). Zbog toga što su protofilamenti u mikrotubulima paralelni i uvijek jednako usmjereni, sami mikrotubuli su polarne strukture s izloženim α -tubulinom na minus (-) kraju, a β -tubulinom na plus (+) kraju. Također, zbog velikog broja interakcija među podjedinicama mikrotubuli su vrlo čvrsti i teško savitljivi (Alberts i sur. 2002).

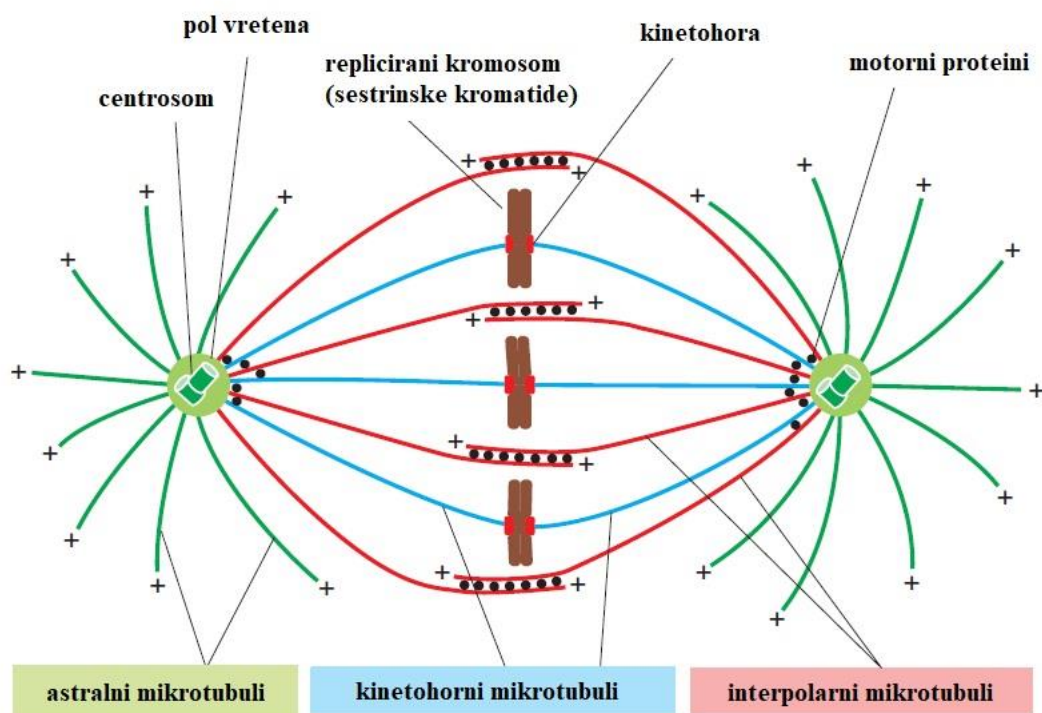


Slika 1.2. Struktura mikrotubula. Na slici lijevo je shematski prikaz heterodimera tubulina koji je ujedno i podjedinica mikrotubula te jednog protofilamenta. Desno je shematski prikaz mikrotubula i njegovog presjeka. Preuzeto i prilagođeno prema Alberts (2002).

Mikrotubuli su iznimno dinamične strukture koje se stalno produljuju i skraćuju, a njihova dinamičnost je različita ovisno o fazi staničnog ciklusa. U stanicama u interfazi mikrotubuli su dio citoskeleta te sudjeluju u staničnom transportu i gibanju i tada je njihova dinamičnost manja u odnosu na fazu mitoze gdje oni postaju građevni element diobenog vretena. Dinamika mikrotubula prije svega ovisi o vezanju i hidrolizi GTP-a pri čemu se hidroliza GTP-a u GDP odvija samo u β -tubulinskoj podjedinici. Kada je na kraju mikrotubula na β -tubulinu vezan GTP postoji tendencija rasta mikrotubula, dok u GDP-veznom stanju dolazi do savijanja protofilamenata mikrotubula čime se znatno olakšava njihovo skraćivanje odnosno depolimerizacija. Budući da je β -tubulin izložen na (+) kraju mikrotubula, on je puno dinamičniji tj. podložniji skraćivanju i produljivanju od (-) kraja. Općenito, mikrotubuli su iznimno dinamički nestabilni, ali u stanicama se mogu stabilizirati određenim proteinima ili vezanjem na druge strukture (primjerice centrosomi u polovima vretena štite (-) krajeve mikrotubula) (Alberts i sur. 2002).

1.2.2. Organizacija mikrotubula u diobenom vretenu

Diobeno vreteno stanica sisavaca sadrži mnoštvo mikrotubula koji su povezani motornim proteinima i proteinima koji ih pasivno povezuju. Da bismo lakše razumjeli strukturu diobenog vretena, mikrotubuli su podijeljeni u više kategorija. Obzirom na to jesu li mikrotubuli vezani na kinetohore - proteinske komplekse na kromosomima, dijelimo ih na kinetohorne koji su vezani i nekinetohorne koji nisu vezani (Cheeseman i Desai, 2008, Prosser i Pelletier, 2017). Kinetohorni mikrotubuli se međusobno povezuju i tvore svežnjeve paralelnih mikrotubula koje nazivamo kinetohornim svežnjevima ili vlaknima, a na kinetohore su vezani svojim (+) krajevima (Cheeseman i Desai, 2008). Nekinetohorne mikrotubule, obzirom na mjesto gdje se nalaze u vretenu možemo podijeliti na astralne i interpolarne. Astralni mikrotubuli se pružaju od polova vretena prema staničnom korteksu. Interpolarni mikrotubuli se pružaju od polova prema središtu vretena gdje stvaraju antiparalelne svežnjeve zbog čega ih nazivamo i preklapajućim mikrotubulima (Tolić 2017). Shematski prikaz podjele mikrotubula prikazan je na slici 1.3.

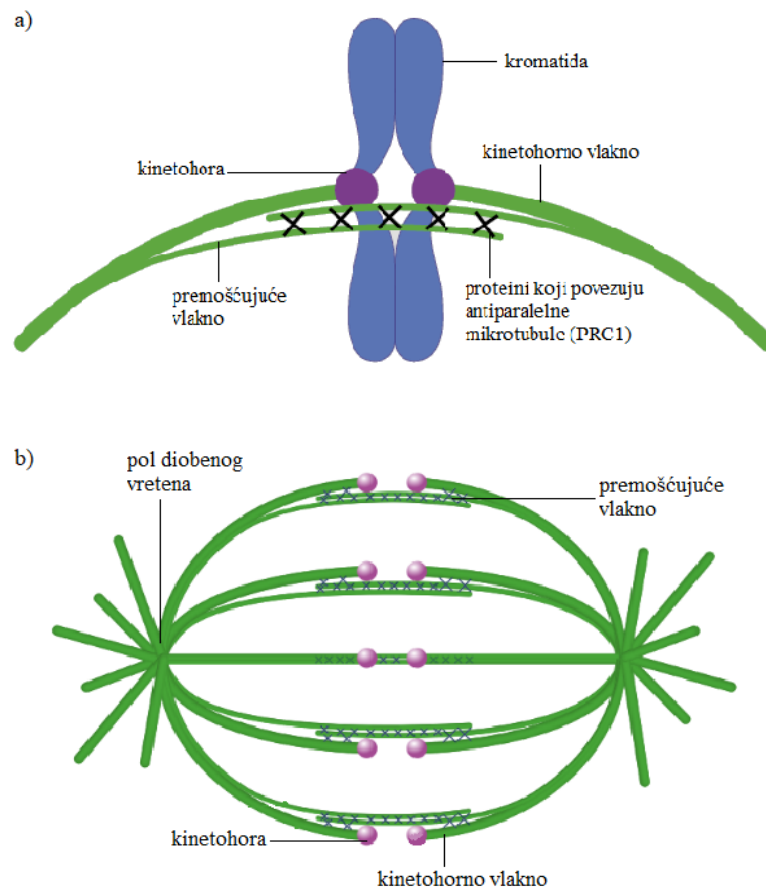


Slika 1.3. Shematski prikaz mikrotubula u diobenom vretenu prema klasičnom modelu.

Vrste mikrotubula označene su na donjem dijelu slike, dok su na gornjem dijelu označene važne komponente diobenog vretena. Preuzeto i prilagođeno prema Alberts (2002).

U klasičnom modelu diobenog vretena samo kinetohorni svežnjevi mogu generirati sile na kinetohorama jer su direktno vezani na njih, a interakcije kinetohornih svežnjeva s interpolarnima su slabe i uglavnom prisutne u blizini polova. Međutim, promatranjem oblika kinetohornih svežnjeva koji su u vretenu ljudskih stanica zakrivljeni, a prema klasičnom modelu bi trebali biti ravni i nizom drugih eksperimentalnih dokaza nedavno je utvrđeno postojanje snažnih interakcija između kinetohornih i interpolarnih mikrotubula. Interpolarna vlakna koja su vezana za kinetohorne nazvana su premošćujućim vlaknima (eng. *bridging fiber*) jer povezuju (premošćuju) sestrinska kinetohorna vlakna (Kajtez i sur. 2016). Model koji uključuje premošćujuća vlakna objašnjava zaobljenost kinetohornih vlakana i pruža objašnjenje na koji način su uravnotežene sile unutar metafaznog diobenog vretena (Tolić i Pavin 2016). Osim toga pokazano je da su u metafazi gotovo sva interpolarna vlakna vezana za kinetohorna vlakna tj. da predstavljaju premošćujuća vlakna. Do sada je pokazano da protein

regulator citokineze 1, PRC1 (eng. *protein regulator of cytokinesis 1*) ima ključnu ulogu u povezivanju antiparalelnih mikrotubula u premošćujućim vlaknima (Polak i sur. 2017).

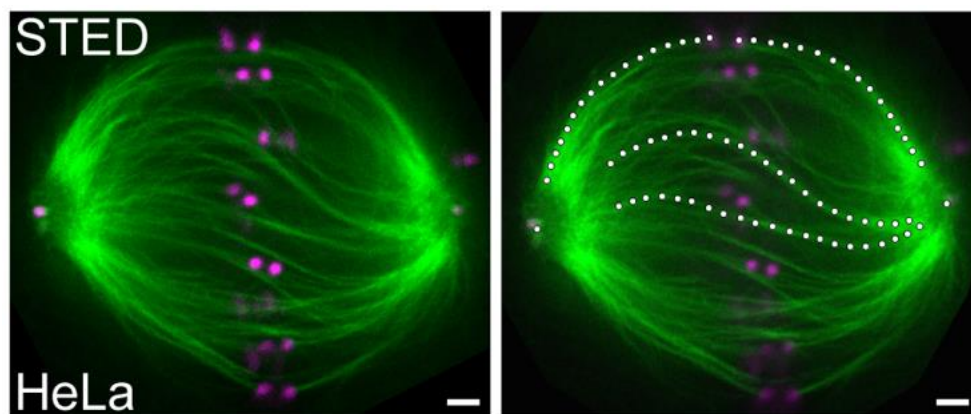


Slika 1.4. Shematski prikaz premošćujućeg vlakna mikrotubula i njegov prikaz u shemi diobenog vretena. Na slici a) shematski je prikazana struktura premošćujućeg vlakna. Preuzeto i prilagođeno prema Simunić i Tolić (2016). Na slici b) je shematski prikazano kako praktički sva preklapajuća vlakna mikrotubula u metafaznom diobenom vretenu predstavljaju premošćujuće mikrotubule. Preuzeto i prilagođeno prema Polak i sur. (2017).

1.2.3. Kiralnost diobenog vretena

U nedavnom radu otkriveno je novo svojstvo mitotskog diobenog vretena: njegova kiralnost. Najprije je na snimkama dobivenim super-rezolucijskom STED (eng. *stimulated emission depletion*) mikroskopijom zamijećeno da su vlakna mikrotubula gotovo kontinuirana od pola do pola i stvaraju kompleksne zakrivljene oblike. Vanjska vlakna uglavnom imaju oblik poput

slova C, dok ona unutarnja nerijetko imaju oblik poput slova S (Slika 1.5.). Daljnjim proučavanjem prostorne organizacije vlakana mikrotubula u diobenom vretenu utvrđeno je da ona stvaraju blagu lijevu uzvojnici čiji je prosječni helicitet $-2^\circ/\mu\text{m}$. Također je primijećeno da motorni protein kinezin-5 (Eg5) ima važnu ulogu u stvaranju heliciteta mikrotubula jer se helicitet značajno smanjuje inhibicijom njegove motorne aktivnosti. Kako je u radu Yajima i suradnika (2008) pokazano je da motorni protein Eg5 stvara okretni moment na mikrotubulima prilikom kretanja po njima, trenutno se pretpostavlja da helicitet vlakana u diobenom vretenu može nastati upravo zbog okretnog momenta. Osim kinezina-5 i drugi motorni proteini poput kinezina-14, kinezina-8 i dineina mogu biti uključeni u stvaranje okretnog momenta (Walker i sur. 1990, Bormuth i sur. 2012, Can i sur. 2014). Prema ovoj pretpostavci, uzrok heliciteta vlakana u diobenom vretenu jest okretni moment u samome vretenu te na njega ne bi trebale utjecati nikakve sile niti momenti koji djeluju na vretenu izvana. U dosadašnjem radu helicitet vlakana potvrđen je u ljudskim tumorskim stanicama linija HeLa i U2OS. Potrebna su dodatna istraživanja da bi se dokazalo kako dolazi do heliciteta vlakana i koja je njegova uloga u diobenom vretenu (Novak i sur. 2017).



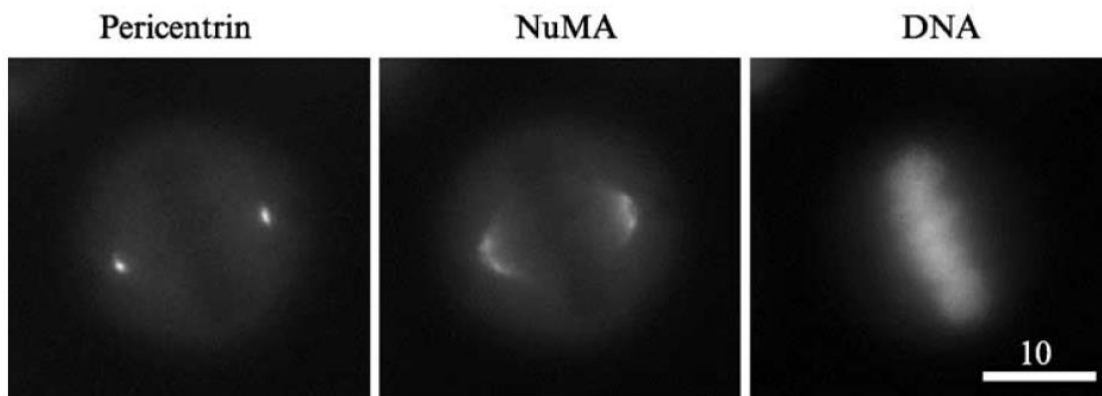
Slika 1.5. Snimka metafaznog diobenog vretena stanične linije HeLa dobivena super-rezolucijskom STED mikroskopijom. Na desnoj slici prikazano je isto diobeno vreteno kao i na lijevoj te je označena kontura koju stvaraju pojedina vlakna mikrotubula. Zeleno su vizualizirani mikrotubuli, ružičasto kinetohore, a mjerilo je $1\ \mu\text{m}$. Preuzeto iz Novak i sur. (2017).

1.3. Proteini u diobenom vretenu

U mitotskom diobenom vretenu nalazimo iznimno velik broj proteina koji reguliraju njegovu dinamiku, strukturu i funkciju. Do sada je poznato njih oko 150, a možemo ih podijeliti u šest funkcionalnih skupina (Sauer i sur. 2005). To su (1) proteini koji nukleiraju mikrotubule, (2) motorni proteini, (3) proteini koji utječu na polimerizaciju i depolimerizaciju mikrotubula, (4) proteini koji međusobno povezuju mikrotubule (eng. *cross-linkers*), (5) proteini koji režu mikrotubule i (6) regulatorni proteini (Fant i sur. 2004). U ovome radu najveći fokus je na protein NuMA koji možemo svrstati u proteine koji međusobno povezuju mikrotubule. Također, proučavani su motorni protein kinezin-5 (Eg5) te protein LGN koji prema trenutnim saznanjima nije protein na diobenom vretenu, ali sudjeluje u pozicioniranju diobenog vretena unutar stanice. Više o tim proteinima opisano je u sljedećim poglavljima.

1.3.1. Lokalizacija i uloga proteina NuMA

Protein NuMA otkriven je kao protein koji mijenja svoju lokalizaciju od jezgre u interfazi do polova diobenog vretena u mitozu, prema čemu je i dobio ime (eng. *nucleus and mitotic apparatus*) (Sun i Schatten 2006). Tijekom interfaze formira jezgrin matriks, a u ranoj profazi disocira s kondenziranih kromosoma i nakon puknuća jezgrine ovojnice premješta se na diobeno vreteno. NuMA se u diobenom vretenu koncentrira u području polova, na prostoru gdje se nalaze (-) krajevi mikrotubula, a signal koji možemo vidjeti promatrajući njezinu lokalizaciju podsjeća na dva polumjeseca na polovima. Upravo to što signal nije točkasti i isključiv u polovima upućuje na to da NuMA nije centrosomalni protein (Slika 1.6). U telofazi, NuMA se vraća u jezgru aktivnim transportom kroz jezgrine pore (Fant i sur. 2004). Tijekom mitoze, NuMA se osim na samom diobenom vretenu nalazi i na staničnom korteksu u kompleksu s proteinom LGN (eng. *leucine-glycine-asparagine*) (di Pietro i sur. 2016). Promjena lokalizacije proteina NuMA unutar staničnog ciklusa regulirana je prvenstveno na razini fosforilacije i defosforilacije. Što se tiče dinamike proteina NuMA, zabilježeno je da postoje tri skupine (eng. *pool*): oko 20% ukupne količine proteina NuMA vezano je čvrsto na polove, dok ostatak čine skupina gdje se NuMA nalazi na vretenu, ali s njega lako disocira i skupina koja se odnosi na protein NuMA "otopljen" u citosolu. Prosječno vrijeme izmjene ove dvije skupine jest oko tri minute (Kisurina-Evgenieva i sur. 2004).



Slika 1.6. Lokalizacija pericentrina i proteina NuMA u metafaznom diobenom vretenu. Signal pericentrina koji predstavlja lokalizaciju centrosoma je točkast, dok signal proteina NuMA podsjeća na dva polumjeseca. Signal DNA potvrđuje da je stanica u metafazi. Sve tri slike prikazuju istu stanicu stanične linije HeLa, a mjerilo je 10 μm . Preuzeto iz Fant i sur. (2004).

Smatra se da je primarna uloga proteina NuMA u diobenom vretenu fokusiranje (-) krajeva mikrotubula u polove i njihovo vezanje na centrosom (Silk i sur. 2009). Iznimno je važno da su polovi u diobenom vretenu dobro definirani i da postoje isključivo dva pola kako bi svaka stanica kćer mogla stvoriti jedinstvenu jezgru s potpunom genetičkom informacijom. U slučaju defekta polova bilo da su defokusirani ili da su prisutna multipolarna vretena, vrlo često dolazi do formiranja mikrojezgri. One najčešće predstavljaju pojedinačne kromosome koji se nisu uspjeli pravilno razdvojiti s ostalim kromosomima tijekom anafaze. Mikrojezgre se često mogu naći u stanicama raka i smatra se da mogu doprinijeti genskoj nestabilnosti u sljedećim diobama stanice. Osim toga, stabilni polovi su nužni za mehanički integritet diobenog vretena zbog sila koje djeluju na njega tijekom metafaze i anafaze (Fant i sur. 2004). Pokazano je da NuMA nije neophodna za inicijalno formiranje bipolarnog vretena, međutim ukoliko u stanici nije prisutna funkcionalna NuMA nakon uspostavljanja tenzije na kinetohorama, dolazi do odvajanja centrosoma od vretena i mikrotubuli na polovima se defokusiraju. Dakle, smatra se da je esencijalna funkcija proteina NuMA na vretenu fizičko vezanje kinetohornih vlakana koja su pod tenzijom na polove te održavanje veze centrosoma i vretena (Silk i sur. 2009). Tome zaključku doprinose i činjenice da ukoliko se utiša ekspresija proteina NuMA u stanicama (eng. *knock down*), u metafazi se kromosomi ne mogu poravnati, a ukoliko se potpuno ukloni ekspresija proteina (eng. *knock out*) nastaju izdužena neorganizirana vretena koja nisu

povezana s centrosomima. S druge strane, ukoliko se protein NuMA pojačano eksprimira, u stanicama se promovira stvaranje multipolarnih vretena (Sun i Schatten 2006).

NuMA stvara kompleks s motornim proteinom dineinom i njegovim adaptorom dinaktinom. Dinein je motorni protein koji se kreće prema (-) kraju mikrotubula i može klizati paralelne mikrotubule da bi ih fokusirao (Sun i Schatten 2006). Do nedavno se vjerovalo da se dinein nakuplja na (-) krajevima mikrotubula tj. na polovima zbog toga što nailazi na kraj mikrotubula te pritom transportira protein NuMA na polove. U radu Hueschen i suradnika (2017) pokazano je da se zapravo NuMA veže za (-) krajeve mikrotubula neovisno o dineinu i da ona regrutira dinein i dinaktin na polove vretena. Dokazana je i direktna interakcija proteina NuMA s kinezinom-5 (Eg5).

Eg5 je motorni protein koji se kreće prema (+) kraju mikrotubula i neophodan je za razdvajanje centrosoma i jedan je od tri motorna proteina (uz kinezin-5 i kinezin-6) koji su nužni za odvijanje mitoze (Waitzman i Rice, 2014). Smatra se da Eg5 razdvaja centrosome tako što kliže antiparalelne mikrotubule (Kozielski 2015). Utvrđeno je da je Eg5 na neki način odgovoran za lokalizaciju NuMA na polovima, ali da za to nije potrebna njegova motorna aktivnost. Naime, ukoliko se utiša ekspresija Eg5, dolazi do stvaranja monopolarnih vretena i NuMA nije prisutna na tom polu. Međutim, ako se inhibira motorna aktivnost proteina Eg5 pomoću specifičnog inhibitora, također dolazi do stvaranja monopolarnih vretena, ali NuMA je u tom slučaju prisutna na polu (Iwakiri i sur. 2013).

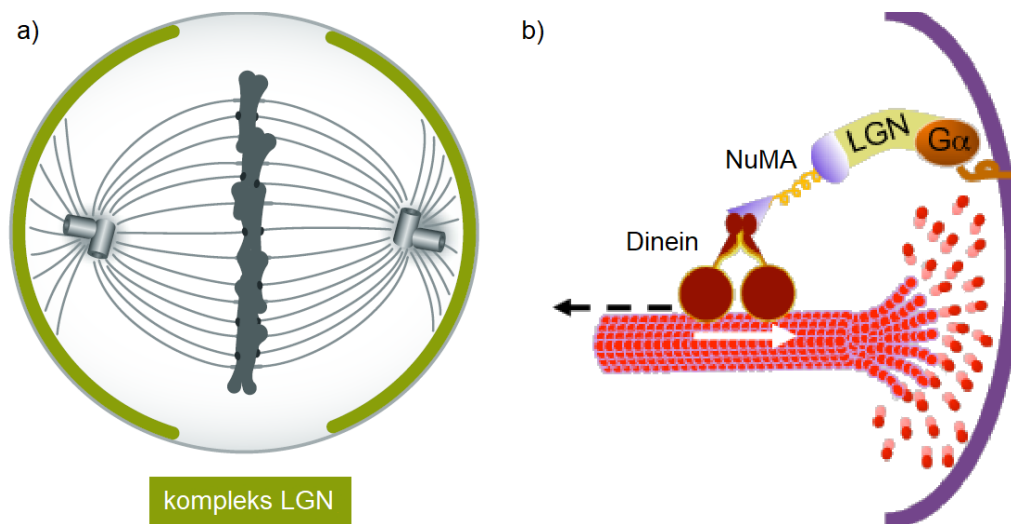
Osim u diobenom vretenu, tijekom mitoze važna je uloga proteina NuMA na staničnom korteksu. Ovdje se NuMA nalazi u kompleksu s proteinom LGN koji je interakcijama s drugim proteinima vezan na aktinski korteks odnosno staničnu membranu (di Pietro i sur. 2016). Više o ulozi proteina NuMA na staničnom korteksu i kompleksu proteina u kojem se ondje nalazi opisano je u sljedećem poglavlju.

1.3.2. Proteini koji sudjeluju u orijentaciji diobenog vretena

Diobeno vreteno, osim što osigurava ispravnu raspodjelu udvostručene genetičke informacije tijekom diobe stanice, svojom orijentacijom određuje os duž koje će se dogoditi dioba. To vrijedi za sve stanice: one koje se uvijek dijele simetrično, ali i one koje se mogu podijeliti i simetrično i asimetrično (di Pietro i sur. 2016). Kod takvih stanica orijentacija diobenog vretena

određuje sudbinu stanica kćeri primjerice hoće li se matična stanica samoobnavljati simetričnom diobom ili krenuti u diferencijaciju asimetričnom (Radulescu i Cleveland 2010). Uz to, asimetrične diobe su pogotovo važne tijekom embrionalnog razvoja. Osim sudbine stanica, ispravno postavljena os diobe stanice je neophodna za dobro pozicioniranje stanica u tkivima što je posebno izraženo primjerice u epitelu. Sve u svemu, orijentacija i smještaj diobenog vretena su uključeni u fundamentalne razvojne procese i homeostazu tkiva, a njihovi defekti koreliraju s raznim bolestima koje uključuju mikrocefaliju i rak (di Pietro i sur. 2016).

Prema dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da u većini tipova animalnih stanica do pozicioniranja diobenog vretena dolazi prijenosom lokaliziranih vučnih (eng. *pulling*) sila sa staničnog korteksa na astralne mikrotubule. Glavne komponente mašinerije za stvaranje ovih sila su: (1) $G_{\alpha i}$ podjedinica heterotrimernog G proteina, (2) protein LGN, (3) protein NuMA i (4) dinein s dinaktinom, a kompleks ovih proteina naziva se još i LGN kompleks. Na osnovu dosadašnje karakterizacije dinamike diobenog vretena u nekoliko različitih sustava pretpostavlja se da prilikom ulaska stanice u mitozu protein LGN dolazi na staničnu membranu interakcijom s nekoliko molekula $G_{\alpha i}$ koje su pomoću miristoilne skupine usidrene u membrani. LGN tada djeluje kao receptor za protein NuMA koji pak asocira s motornim proteinom dineinom i njegovim adaptorom dinaktinom. Kretanje dineina prema (-) kraju astralnih mikrotubula stvara vučne sile koje omogućuju pozicioniranje diobenog vretena u stanici (Carminati i sur. 2016). Prema tome, specifična lokalizacija LGN kompleksa određuje mjesto koncentracije stvaranja vučne sile pa prema tome i os diobe stanice (di Pietro i sur. 2016). Shematski prikaz lokalizacije kompleksa LGN i proteina od kojih je sastavljen prikazan je na slici 1.7.



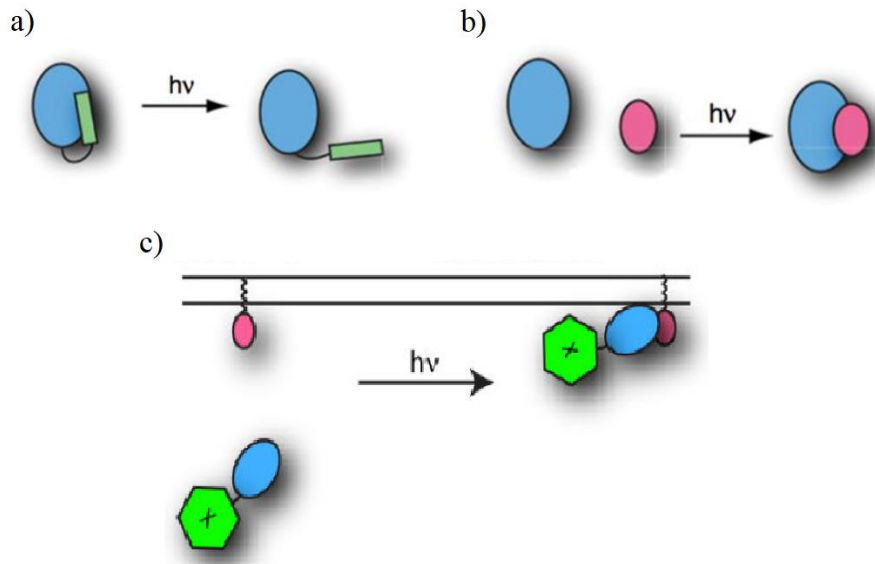
Slika 1.7. Lokalizacija kompleksa LGN u stanici tijekom metafaze i njegov shematski prikaz. Slika a) prikazuje prostor na staničnom korteksu koji zauzima kompleks LGN tijekom metafaze označen zelenom bojom. Preuzeto iz di Pietro i sur. (2016). Na slici b) shematski su prikazani proteini koji čine kompleks LGN, a astralni mikrotubul je prikazan crvenom bojom. Crna isprekidana strelica prikazuje smjer kretanja dineina po astralnim mikrotubulima, a bijela strelica predstavlja tako generiranu vučnu silu na mikrotubulima. Preuzeto i prilagođeno prema Gönczy (2008).

Protein LGN dobio je ime po tome što sadrži ponavljanja aminokiselinskog motiva Leu-Gly-Asn. Iako je njegova jedina do sada dobro opisana uloga sudjelovanje u orijentaciji diobenog vretena, primijećeno je da promjena ekspresije ovog proteina u stanici utječe na fenotip samog diobenog vretena (Radulescu i Cleveland 2010). Zanimljivo je da i utišavanje ekspresije i prekomjerna ekspresija LGN-a stvaraju sličan fenotip : poremećaj u organizaciji diobenog vretena i segregaciji kromosoma te stvaranje multipolarnih vretena. Bipolarna vretena u stanicama s promijenjenom ekspresijom proteina LGN često budu slabije fokusirana. Kako vezanje LGN-a za protein NuMA blokira njegove interakcije s mikrotubulima, smatra se da je LGN važan ne samo za orijentaciju diobenog vretena već i za njegovo sastavljanje (Du i sur. 2002).

1.4. Optogenetičke metode

Tijekom zadnjeg desetljeća proteini osjetljivi na svjetlost postali su jako koristan alat u istraživanju brojnih bioloških funkcija (Mukherjee i sur. 2017). Iako je početak korištenja takvih proteina bio u neuroznanosti za kontrolu funkcije neurona, sve je veća primjena u staničnoj biologiji za proučavanje prenošenja signala, aktivacije ili represije ekspresije gena te kontrole lokalizacije proteina (Tucker i sur. 2014). Da bi došlo do kontrole bioloških funkcija u stanicama svjetlom, stanice moraju ekspimirati egzogeni protein osjetljiv na svjetlost dobiven tehnikama genetičkog inženjerstva. Tako je stvoren pojam optogenetika koji obuhvaća kombinaciju optičkih i genetičkih metoda u svrhu prostorne i vremenske kontrole događaja u stanicama (Deisseroth 2011). Velika prednost svjetla kao pokretača staničnih događaja bazira se na činjenici da se svjetlost može primijeniti u vrlo kratkom i kontroliranom vremenskom periodu (na razini milisekunda) i u jako preciznoj poziciji primjerice u određenim stanicama ili čak u substaničnim domenama (Tucker i sur. 2014). Domene osjetljive na svjetlost koje se fuzioniraju s proteinima od interesa i omogućuju funkcioniranje optogenetičkih sustava najčešće su dobivene iz različitih fotosintetskih organizama, a dodatnim se mutacijama mijenjaju njihova svojstva ovisno o potrebama eksperimenta (Pudasaini i sur. 2015).

Generalno postoje dva osnovna načina kontrole staničnih događaja pomoću svjetla. Prvi je alosteričko vezanje fotoosjetljive domene s proteinom od interesa tako da promjena konformacije fotoosjetljive domene prilikom osvjetljavanja rezultira promjenom aktivnosti proteina od interesa ili promjenom njegovog vezanja za druge molekule. Ovaj pristup najčešće se koristi za kontrolu malih GTP-aza, ionskih kanala, vezanja na DNA i dr. Drugi pristup podrazumijeva stvaranje dimera pod utjecajem svjetlosti na način da fotoosjetljivi protein i protein od interesa mogu stvarati međusobne interakcije samo pod specifičnim uvjetima osvjetljenja. Ovakav sustav često se koristi za kontrolu brojnih važnih bioloških procesa kao što su transkripcija, rekombinacija DNA, fosfoinozidna signalizacija te izlučivanje proteina. Osim toga sustav "optičkih dimera" može se primijeniti za kontrolu lokalizacije proteina pomoću svjetla (Tucker i sur. 2014). To se postiže sustavom u kojem dolazi do dimerizacije inducirane svjetlom između proteina od interesa i proteina "mamca" koji se nalazi na određenoj staničnoj strukturi, primjerice na mitohondrijima ili staničnoj membrani, čime dolazi do translokacije proteina od interesa na tu strukturu (Milas i sur. 2018). Ovaj pristup može biti vrlo koristan jer je aktivnost proteina najčešće iznimno ovisna o njegovoj lokalizaciji (Inoue i sur. 2005). Sheme načina funkcioniranja navedenih sustava prikazane su na slici 1.8.



Slika 1.8. Shematski prikaz osnovnih strategija kontrole proteinskih interakcija svjetlom. Slika a) prikazuje promjenu konformacije fotoosjetljive domene fuzionirane s proteinom od interesa, a slika b) prikazuje dimerizaciju proteina kontroliranu svjetlošću. Na slici c) je prikazana kontrola lokalizacije proteina pomoću svjetlosti što je još jedan način kontrole dimerizacije. Preuzeto iz Tucker i sur. (2014).

1.4.1. Optogenetički sustav iLID

U ovome diplomskom radu korišten je prethodno razvijeni sustav iLID (eng. *improved Light-Inducible Dimer*) iz rada Guntasa i suradnika (2015). Sustav se temelji na osjetljivosti domene LOV2 (eng. *Light-oxygen-voltage-sensing*) iz vrste *Avena sativa* na plavo svjetlo. Domena LOV iz različitih vrsta je jedna od najčešće korištenih fotoosjetljivih domena u optogenetičkim sustavima, a pod utjecajem plavog svjetla dolazi do promjene njezine konformacije (Pudasaini i sur. 2015). Osim domene LOV2, za funkcioniranje sustava bitni su i protein SspB i peptid SsrA iz bakterije *Escherichia coli* koji međusobnim interakcijama stvaraju dimere. Dakle, sustav iLID se sastoji od dvije komponente: jedna je protein od interesa koji je fuzioniran s proteinom SspB, a druga je fuzijski protein (koji se također naziva iLID) dobiven fuzijom fotoosjetljive domene LOV2, peptida SsrA i peptida CAAX pomoću kojeg se ova komponenta usidri na staničnu membranu. Da bismo mogli vizualizirati obje komponente sustava, one sadrže i fluorescentne proteine, preciznije, s proteinom od interesa i proteinom SspB fuzioniran

je crveni fluorescentni protein (eng. *red fluorescent protein*, RFP), a s proteinom iLID je fuzioniran žuti fluorescentni protein Venus (Milas i sur. 2018).

Kada sustav nije izložen plavom svjetlu, konformacija domene LOV2 je takva da ne može doći do dimerizacije proteina SspB s peptidom SsrA. Međutim, kada se sustav izloži plavom svjetlu (valne duljine 488 nm), dolazi do konformacijske promjene domene LOV2 koja zatim omogućuje dimerizaciju proteina SspB s peptidom SsrA, a posljedica toga je dolazak proteina od interesa na membranu. Kada se ugasi plavo svjetlo, opada afinitet vezanja proteina SspB i peptida SsrA te protein od interesa disocira sa stanične membrane i može se vratiti na svoje originalno mjesto djelovanja. Važno je napomenuti da uspješnost promjene lokalizacije proteina od interesa ovom metodom iznimno ovisi o prirodnoj dinamici proteina i njegovom afinitetu za vezanje na druge proteine ili strukture u stanici. U principu, ukoliko protein ima manji afinitet vezanja za druge strukture, ova metoda će biti efikasnija dok ukoliko je afinitet vezanja velik, promjena njegove lokalizacije ovom metodom može biti manje uspješna (Milas i sur. 2018).

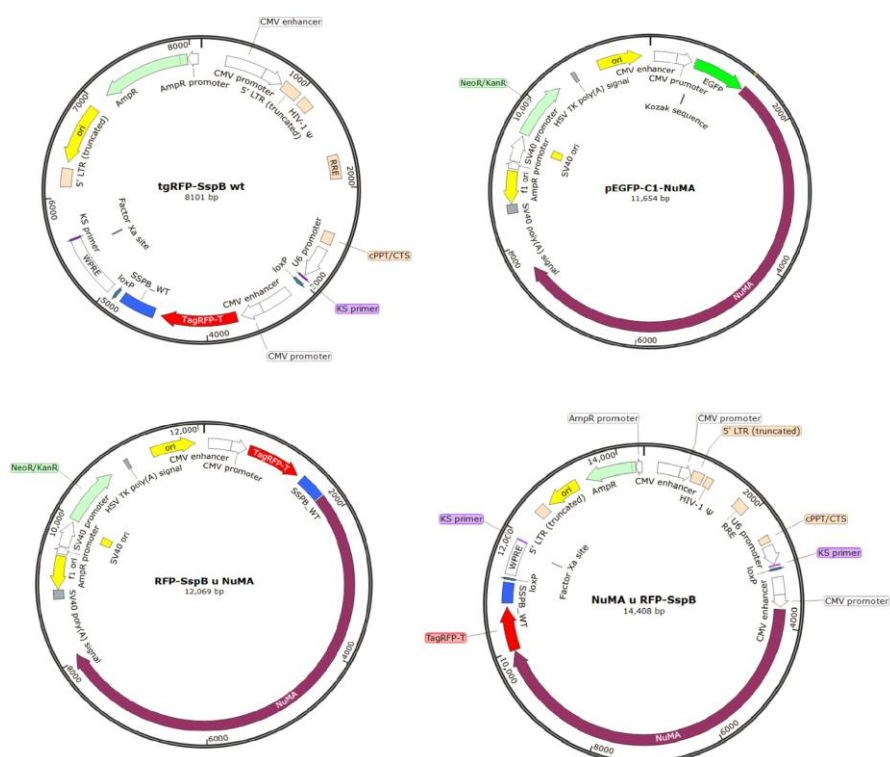
1.5. Cilj istraživanja

Prvi cilj istraživanja ovog diplomskog rada je odrediti ulogu proteina NuMA u sastavljanju i arhitekturi diobenog vretena promatranjem promjena zbog utišavanja proteina LGN, s kojim stvara kompleks na staničnom korteksu. Također provjerit će se utječu li sile koje djeluju na diobeno vreteno preko tog kompleksa na kiralnost vretena te utjecaj utišavanja proteina LGN na lokalizaciju motornog proteina Eg5 koji sudjeluje u lokalizaciji proteina NuMA. Drugi cilj je razviti optogenetički sustav baziran na sustavu iLID za protein NuMA i istražiti može li se protein NuMA ovom metodom ukloniti s diobenog vretena na staničnu membranu tijekom mitoze. Ukoliko je to moguće, istražiti će se učinak njegove delokalizacije na arhitekturu diobenog vretena.

2. Materijali i metode

2.1. Konstrukcija plazmida

Za dobivanje optogenetičkog sustava za protein NuMA bilo je potrebno konstruirati odgovarajući plazmid u kojem je protein NuMA fuzioniran s crvenim fluorescentnim proteinom (eng. *Red Fluorescent Protein*, RFP) i peptidom SspB za dimerizaciju. Za konstrukciju korišteni su plazmidi tgRFPt-SspB WT (Addgene plazmid # 60415) i pEGFP-C1-NuMA (Addgene plazmid # 81029). Kloniranje odgovarajućeg kodirajućeg slijeda u vektor napravljeno je korištenjem komercijalnog kompleta In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, CA, SAD). Za dobivanje željenog plazmida korištena su dva pristupa: ugradnja kodirajućeg slijeda proteina NuMA u vektor tgRFPt-SspB WT i ugradnja kodirajućeg slijeda za RFP-SspB u vektor pEGFP-C1-NuMA pri čemu je iz vektora izbačen kodirajući slijed za GFP. Mape početnih i konstruiranih plazmida prikazane su na slici 2.1.



Slika 2.1. Mape korištenih i konstruiranih plazmida. Gore su prikazani plazmidi korišteni za konstrukciju: tgRFP-SspB-wt i pEGFP-C1-NuMA, a dolje plazmid konstruiran ugradnjom slijeda za RFP-SspB u pEGFP-C1-NuMA i plazmid konstruiran ugradnjom slijeda za protein NuMA u tgRFP-SspB-wt.

2.1.1. Umnažanje željenog fragmenta lančanom reakcijom polimeraze

Početnice za lančane reakcije polimerazom (eng. *Polimerase Chain Reaction*, PCR) dizajnirane su ručno i provjerene pomoću programa SnapGene (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, SAD). Dizajn početnica napravljen je prema uputama proizvođača za In-Fusion kloniranje: na 5' kraj početnice dodano je 15 nukleotida komplementarnih krajevima lineariziranog vektora. Kako u plazmidima na željenom mjestu ugradnje nije bila prisutna Kozak sekvenca, dizajnirane su i početnice koje su ju sadržavale. Dizajnirane početnice nabavljene su od proizvođača Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska), a njihove sekvence prikazane su u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Sekvence dizajniranih početnica za umnažanje željenih fragmenata.

Ime početnice	Sekvenca (5' → 3')
RFPS-F	CGCTAGCGCTACCGGATGGTGTCTAAGGGCGAAGA
RFPS-K-F	CGCTAGCGCTACCGGGCCACCATGGTGTCTAAGGGCGAAGA
RFPS-R	TAGATCTGAGTCCGGAACCAATATTCACTCGTCATAGA
NuMA-F	GCTAGAATTGACCGGATGACACTCCACGCCACCC
NuMA-K-F	GCTAGAATTGACCGGGCCACCATGACACTCCACGCCACCC
NuMA-R	CATGGTGGCGACCGGGTGCTTTGCCTTGCCCTTG

Početnice RFPS-F, RFPS-K-F i RFPS-R korištene su za umnažanje kodirajućeg slijeda za proteine RFP i SspB (pri čemu RFPS-K-F ima dodanu Kozak sekvencu), a kalup je bio plazmid tgRFPt-SspB WT. Za umnažanje kodirajućeg slijeda proteina NuMA korištene su početnice NuMA-F, NuMA-K-F i NuMA-R (pri čemu NuMA-K-F ima dodanu sekvencu Kozak), a kalup za te reakcije bio je plazmid pEGFP-C1-NuMA.

Navedene reakcije PCR napravljene su pomoću smjese za PCR *CloneAmp HiFi PCR Premix* (Clontech) koja je dio kompleta za kloniranje *In-Fusion*. Sastav cjelokupne smjese za reakcije i uvjeti reakcije napravljeni su prema uputama proizvođača i prikazani na tablicama 2.2. i 2.3.

Tablica 2.2. Smjesa za PCR.

Reagens	Količina
<i>CloneAmp HiFi PCR Premix</i>	12,5 μ L
Početinica <i>forward</i>	7,5 pmol
Početnica <i>reverse</i>	7,5 pmol
Kalup (plazmidna DNA)	2 ng
ReH ₂ O	do 25 μ L

Tablica 2.3. Uvjeti PCR reakcija.

	Temperatura / °C		Trajanje		Broj ciklusa
	tgRFP-SspB	NuMA	tgRFP-SspB	NuMA	
Početna denaturacija	98	98	1 min	1 min	1
Denaturacija	98	98	10 s	10 s	35
Sparivanje početnica	57	58	15 s	15s	35
Produljivanje	72	72	7 s	42 s	35
Završno produljivanje	72	72	5 min	5 min	1

2.1.2. Linearizacija plazmida

Korišteni plazmidi linearizirani su odgovarajućim restrikcijskim enzimima (New England BioLabs). Plazmid tgRFPt-SspB WT lineariziran je pomoću restrikcijskog enzima AgeI-HF prema uputama proizvođača. Za restrikciju korišten je preporučeni pufer CutSmart. Reakcijska smjesa sastojala se od 2,3 μ L enzima AgeI-HF, 3 μ g plazmidne DNA, 5 μ L pufera CutSmart i redestilirane vode tako da je ukupni volumen reakcije bio 50 μ L. Restrikcija je provedena na 37 °C tijekom 40 minuta nakon čega je uslijedilo blokiranje enzima 20 minuta na 65 °C.

Za linearizaciju plazmida pEGFP-C1-NuMA bila su potrebna dva restrikcijska enzima: AgeI i BspEI da bi se iz vektora izrezaio kodirajući slijed za GFP. Kako su za ta dva enzima preporučeni različiti puferi, prvo je napravljena restrikcija enzimom AgeI-HF na isti način kao

u slučaju linearizacije plazmida tgRFpT-SspB WT osim što je korišteno 5 µg plazmidne DNA i 4,8 µL enzima. Nakon inaktivacije enzima, linearizirani plazmid je pročišćen iz agaroznog gela (detaljniji opis u sljedećem odjeljku) pomoću komercijalnog kompleta *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Clontech). Nakon toga je uslijedila restrikcija enzimom BspEI. U reakciji je korišteno 40 µL pročišćenog plazmida lineariziranog enzimom AgeI-HF, 4 µL enzima BspEI, 5 µL pufera NEBuffer 3.1 i redestilirana voda do ukupnog volumena od 50 µL. Restrikcija je provedena pri temperaturi od 37 °C tijekom 30 minuta, a inaktivacija enzima je napravljena pri temperaturi 80 °C tijekom 20 minuta.

2.1.3. Gel elektroforeza na agaroznom gelu i pročišćavanje produkata PCR i lineariziranih vektora

Za utvrđivanje uspješnosti PCR i restrikcijskih reakcija te za kasnije pročišćavanje željene DNA potrebne za daljnje korake kloniranja korištena je gel elektroforeza na agaroznom gelu. Pripremljeni su 1%-tni agarozni gelovi otapanjem 0,4 g agaroze u 40 mL pufera TAE (Tris koncentracije 40 mM, octena kiselina koncentracije 20 mM i EDTA koncentracije 1mM; pH bio pufera je 8,0). Otopina je dovedena do vrenja da bi se sva agarozna otoplila, a nakon što se dovoljno ohladila dodano je 4 µL boje *GelStar Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, Bazel, Švicarska). Nakon toga otopina je izlivena u odgovarajući kalup i gel se polimerizirao 20 minuta.

Agarozni gel je zatim prenesen u kadicu za elektroforezu te je dodan TAE pufer u količini dovoljnoj da potpuno prekrije gel. U jednu jažicu gela je nanoseno 10 µL standarda veličine 1kb *Quick-Loading DNA ladder* (New England BioLabs). Za provjeru reakcija PCR pomješano je ukupan volumen reakcije (25 µL) i 5 µL boje za nanošenje uzoraka na gel *Gel loading dye* (New England BioLabs, Hertfordshire, UK) te je po 15 µL dobivene smjese raspoređeno u dvije jažice gela. Za izolaciju lineariziranih vektora pomješano je 50 µL restrikcijske reakcije s 10 µL boje za nanošenje uzoraka te je po 20 µL dobivene smjese raspoređeno u tri jažice. Elektroforeza je izvedena pri naponu od 90 V tijekom 30-45 minuta. Vizualizacija fluorescentno obilježenih molekula DNA potrebna za izrezivanje željenih produkata restrikcije i PCR-a provedena je pomoću uređaja UVIDOC HD6 (Uvitec, Cambridge, UK). Nakon izrezivanja, željeni fragmenti i linearizirani vektori su pročišćeni iz agaroznog gela pomoću komercijalnog kompleta *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Clontech) prema uputama proizvođača.

2.1.4. Reakcija kloniranja

Za ugradnju željenog produkta PCR u linearizirani vektor korišten je komercijalni komplet *In-Fusion HD Cloning Kit*. U slučaju ugradnje kodirajućeg slijeda za RFP-SspB u linearizirani vektor pEGFP-C1-NuMA iz kojeg je izbačen GFP, u reakciji je korišteno 100 ng plazmidne DNA i 200 ng produkta PCR. Za ugradnju kodirajućeg slijeda za protein NuMA u linearizirani vektor tgRFpT-SspB WT korišteno je 100 ng plazmidne DNA i također 100 ng PCR produkta. U svim reakcijama dodano je još 4 µL reakcijske smjese *In-Fusion HD Enzyme Premix* te redestilirane vode do ukupnog volumena od 20 µL. Za negativne kontrole reakcije u smjesu je dodano sve osim PCR produkata. Reakcija je provedena na 50 °C tijekom 15 minuta i zatim zaustavljena na ledu.

2.1.5. Transformacija bakterija

Produkti reakcije kloniranja uneseni su u kemijski kompetentne bakterije *Escherichia coli* (Stellar Competent Cells, Clontech) koje su dio kompleta za kloniranje *In-Fusion*. Transformacija je napravljena prema uputama proizvođača, a 50 µL kompetentnih stanica je transformirano s 5 µL *In-Fusion* reakcije metodom toplinskog šoka: bakterije su bile na ledu tijekom 30 minuta, na temperaturi od 42°C tijekom 45 sekundi i ponovno na ledu tijekom 2 minute. Zatim je dodano 500 µL medija SOC te su bakterije inkubirane 1h na temperaturi 37 °C. Svaka transformacijska smjesa je zatim raspoređena na dvije krute hranjive podloge tako da je na jednu stavljeno 100 µL ukupne smjese, a na drugu je nanesen ostatak bakterija dobiven nakon centrifugiranja (5 min na 6000 RPM) i resuspendiranja u 100 µL medija SOC. Krute hranjive podloge sadržavale su medij LB (5 g kvašćevog ekstrakta, 10 g triptona, 10 g NaCl i 16 g agara u 1 L medija) uz dodatak ampicilina za reakcije *In-Fusion* gdje je korišten vektor bio pEGFP-C1-NuMA te uz dodatak kanamicina za korišteni vektor tgRFpT-SspB WT, uključujući i kontrolne reakcije. Bakterije su inkubirane na krutim hranjivim podlogama tijekom noći na 37 °C.

2.1.6. Reakcija PCR s bakterijskim kolonijama kao kalupom

Za prvu potvrdu ugradnje fragmenata dobivenih PCR-om u željene linearizirane vektore napravljen je PCR na kolonijama transformiranih bakterija. Za ovu reakciju PCR korištena je komercijalno dostupna reakcijska smjesa *JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Sastav reakcijske smjese za jednu reakciju prikazan je u tablici 2.4. Početnice za ovu reakciju su iste kao i za reakciju dobivanja željenih fragmenata.

Tablica 2.4. Sastav reakcijske smjese za jednu PCR reakciju na kolonijama.

Reagens	Volumen
Reakcijska smjesa JumpStart™	10 µL
Početnica <i>forward</i> (5 pmol/µL)	1,6 µL
Početnica <i>reverse</i> (5 pmol/µL)	1,6 µL
ReH ₂ O	6,8 µL (do 20 µL)

U svaku eprvetu za PCR dodana je reakcijska smjesa i zatim je u njoj resuspendirana kolonija uzeta nastavkom za automatsku mikropipetu s krute podloge. Istim nastavkom razmazan je ostatak bakterija (koji je ostao na nastavku) na novu krutu hranjivu podlogu s odgovarajućim antibiotikom na kojoj su prethodno označena mjesta za svaku pojedinu koloniju. Uvjeti reakcije PCR prikazani su u tablici 2.5.

Tablica 2.5. Uvjeti PCR reakcije na kolonijama.

	Temperatura / °C		Trajanje		Broj ciklusa
	tgRFP-SspB	NuMA	tgRFP-SspB	NuMA	
Početna denaturacija	95	98	10 min	10 min	1
Denaturacija	95	98	30 s	30 s	35
Sparivanje početnica	57	58	30 s	30 s	35
Produljivanje	72	72	2 min	12 min	35
Završno produljivanje	72	72	5 min	12 min	1

Rezultati reakcije PCR na kolonijama analizirani su gel elektroforezom na agaroznom gelu postupkom opisanim u odjeljku 2.1.7.

2.1.7. Izolacija rekombinantnog plazmida

Iz kolonija kod kojih je došlo do umnažanja u reakciji PCR na kolonijama izolirani su plazmidi pomoću komercijalnog kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka). Za izolaciju je korišten protokol proizvođača: bakterije su centrifugirane 5 minuta na 7 000 g i resuspendirane u puferu za lizu. Dodan je pufer za neutralizaciju i uslijedilo je centrifugiranje 10 minuta na 18 000 g. Supernatant je zatim nanešen na kolonice, nakon centrifugiranja 1 minutu na 18 000 g kolonica je isprana odgovarajućim puferom nakon čega je uslijedila elucija plazmidne DNA. Koncentracija izoliranih plazmida izmjerena je pomoću uređaja NanoPhotometer N60 (Implen, München, Njemačka). Za konačnu potvrdu kloniranja i provjeru točnosti ugrađenog fragmenta provedeno je sekvenciranje izoliranih plazmida u DNA-servisu tvrtke Macrogen pomoću početnica korištenih za umnažanje istih fragmenata. Samo plazmidi koji su imali potpuno ispravnu sekvencu nukleotida korišteni su za transfekciju ljudskih stanica.

2.1. Stanična kultura

2.1.1. Uzgoj stanica i priprema za mikroskopiranje

Stanice HeLa sa stabilnom ekspresijom proteina PRC1 fuzioniranim sa zelenim fluorescentnim proteinom (eng. *Green Fluorescent Protein, GFP*) uzgajane su u mediju DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Bazel, Švicarska) s dodatkom 10-postotnog fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal Bovine Serum, FBS*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). U medij su dodani antibiotici geneticin koncentracije 50 µg/mL (Life Technologies, Waltham, MA, SAD), penicilin 100 I.U./mL (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i streptomycin 100 µg/mL (Sigma-Aldrich). Uzgoj stanica bio je na temperaturi 37 °C i u atmosferi s 5% CO₂ u inkubatoru Galaxy 170S (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

Stanice koje su bile korištene za mikroskopiranje su nasađene u posudice za mikroskopiranje koje imaju staklo promjera 35 mm i debljine 1,5 mm (MatTek Corporation, Ashland, SAD). Za vizualizaciju DNA u živim stanicama korištena je boja SiR-DNA (Spirochrome AG, Stein na Rajni, Švicarska) u konačnoj koncentraciji od 100 nM.

2.1.8. *Transfekcija siRNA i plazmida*

Za transfekciju siRNA korišten je komplet *Lipofectamine RNAiMAX* prema uputama proizvođača (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Za transfekciju je pomješano 150 µL medija *Opti-MEM* i 9 µL reagensa *Lipofectamine RNAiMAX* s otopinom siRNA u 150 µL medija *Opti-MEM*. Korišteno je 2 µL siRNA specifične za utišavanje proteina LGN i kontrolne siRNA početne koncentracije 100 µM (Dharmacon, Lafayette, CO, SAD). Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta otopina za transfekciju nakapana je na stanice. Dan ranije nasađeno 180 000 stanica u slučaju inkubacije siRNA tijekom 24 h i 100 000 stanica u slučaju inkubacije tijekom 48 h u posudice za mikroskopiranje. Stanicama koje su imale inkubaciju siRNA tijekom 48 h je 24 h nakon transfekcije promijenjen medij.

Transfekcija plazmida napravljena je pomoću kompleta *Lipofectamine 3000 Reagent* prema uputama proizvođača (Thermo Fisher Scientific). Stanice su transficirane s 1,6 µg plazmida NuMA-RFP-SspB i 0,07 µg plazmida iLID CAAX. Dan prije transfekcije nasađeno je 220 000 stanica u posudice za mikroskopiranje tako da su u trenutku transfekcije stanice bile 80-90 % konfluentne. Medij je promijenjen više od 12 sati nakon transfekcije i 6 sati prije mikroskopiranja.

2.1.9. *Tretman specifičnim inhibitorima motornog proteina Eg5*

Stanice su dan prije tretmana nasađene u posudice za mikroskopiranje. U medij su stanicama dodani specifični inhibitori motornog proteina Eg5 STLC (S-trityl-L-cysteine) (Sigma - Aldrich) u konačnoj koncentraciji 50 µM i FCPT (2-(1-(4-fluorofenil)ciklopropil)-4-(piridin-4-yl)tiazole) (poklon prof. Timothy Mitchison) u konačnoj koncentraciji 20 µM te su stanice vraćene u inkubator. Točno 30 minuta nakon dodatka oba inhibitora stanice su fiksirane i pripremljene za imunofluorescenciju.

2.2. Imunofluorescencija

Metoda imunofluorescencije korištena je za određivanje lokalizacije endogenih proteina NuMA i Eg5 te za određivanje efikasnosti utišavanja endogenog proteina LGN pomoću siRNA. Stanice su fiksirane 24 h ili 48 h nakon transfekcije siRNA specifične za utišavanje proteina LGN i kontrolne siRNA. Fiksacija je provedena dodatkom ledenog metanola (-20 °C) pri čemu su stanice držane na ledu. Najprije je dodano 2 mL metanola u posudicama sa stanicama koje su sadržavale 1 mL medija na 1 minutu. Medij koji je ostavljen u posudici služi kako bi se smanjio osmotski šok prilikom fiksacije. Zatim je sva tekućina odstranjena, dodan je 1 mL metanola na 2 minute nakon čega je ispran. Sva ispiranja izvedena su s 1 mL pufera PBS (eng. *Phosphate-Buffered Saline*) tri puta u trajanju od 5 minuta uz lagano protresanje. Sljedeći korak bila je permeabilizacija membrane postignuta pomoću 0,5%-tne otopine tritona u PBS-u tijekom 15 minuta uz lagano protresanje, nakon čega je uslijedilo ispiranje. Za blokiranje korištena je 1%-tna otopina BSA (eng. *bovine serum albumin*) u PBS-u i stanice su inkubirane u 1 mL otopine tijekom 1h na temperaturi 4 °C uz lagano protresanje. Zatim je uslijedila inkubacija sa specifičnim primarnim antitijelima otopljenim u 1%-tnoj otopini BSA u PBS-u tijekom noći pri temperaturi 4 °C uz lagano protresanje. Popis korištenih primarnih antitijela i pripremljenih razrijeđenja prikazan je u tablici 2.6. Nakon toga stanice su isprane te inkubirane u otopini sekundarnih antitijela 1 h na sobnoj temperaturi u mraku (posudice su bile prekrivene aluminijskom folijom zbog štetnog utjecaja svjetla na fluorescentne boje). Korištena su sekundarna antitijela navedena u tablici 2.7. pri razrijeđenju 1:300 u 1%-tnoj otopini BSA u PBS-u. Nakon inkubacije stanice su isprane te im je dodan 1 mL PBS-a, nakon čega je uslijedilo mikroskopiranje u slučaju da je SiR-DNA za vizualizaciju kromosoma dodana prije fiksacije stanica. U pokusima gdje nije korištena SiR-DNA, za vizualizaciju je korištena fluorescentna boja DAPI na način da su stanice inkubirane tijekom 5 minuta u otopini boje u PBS-u koncentracije 1 µg/mL, nakon čega je slijedilo ispiranje. Ukoliko je mikroskopiranje uslijedilo sljedeći dan, stanice su čuvane u mraku pri temperaturi 4 °C.

Tablica 2.6. Popis primarnih antitijela korištenih za imunofluorescenciju

Primarno antitijelo specifično za protein:	Porijeklo	Proizvođač	kataloški broj	Radna koncentracija
Eg5	miš	Santa Cruz Biotechnology	sc-365681	1:100
LGN	zec	Proteintech	11608-2- AP	1:500
NuMA	miš	Santa Cruz Biotechnology	sc-365532	1:500

Tablica 2.7. Popis sekundarnih antitijela korištenih za imunofluorescenciju

Ime fluorofora	Valna duljina pobuđivanja	Antitijelo specifično za vrstu/porijeklo	Proizvođač	Kataloški broj	Radna koncentracija
Alexa Fluor-594	561 nm	miš/magarac	Abcam	ab150108	1:300
Alexa Fluor-405 F	405 nm	zec/magarac	Abcam	ab175649	1:300

2.3. Svjetlosna mikroskopija i aktivacija optogenetičkog sustava

Za sva snimanja živih stanica i stanica nakon imunofluorescencije korišten je laserski pretražni konfokalni mikroskop Bruker Opterra (Bruker Nano Surfaces, Middleton, WI, SAD) koji je montiran na inverzni mikroskop Nikon Ti-E opremljen uljnim imerzijskim objektivom Nikon CFI Plan Apo VC 100x/1.4 (Nikon, Tokio, Japan). Za kontrolu sustava korišten je program PrairieView 5.4 (Bruker). Pobuđivanje fluorescencije fluorescentno obilježenih proteina i fluorescencijskih boja postignuto je diodnim laserima valne duljine 405, 488, 561 i 640 nm, a

snimke su napravljene kamerom Evolve 512 Delta (Photometrics, Tucson, AZ, SAD). Za snimanje živih stanica bila je osigurana temperatura od 37 °C pomoću komore za zagrijavanje H301-K-frame (Okolab, Pozzuoli, Italija) i atmosfera s 5% CO₂.

2.3.1. Postavke za snimanje živih stanica nakon utišavanja proteina LGN

Žive stanice HeLa s trajno eksprimiranim fuzijskim proteinom PRC1-GFP snimane su kroz 33 ravnine s razmakom od 0,5 µm, da bi se uspješno snimilo cijelo diobeno vreteno. Korištena ekspozicija bila je 200 ms, a apertura 60 µm. Za pobuđivanje fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina (fuzioniranog s proteinom PRC1) korišten je laser valne duljine 488 nm, a za pobuđivanje fluorescencije boje SiR-DNA laser valne duljine 640 nm.

2.3.2. Postavke za snimanja stanica nakon imunofluorescencije

Za snimanje fiksiranih stanica linije Hela sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP također su korištene 33 ravnine međusobno udaljene 0,5 µm. Ekspozicija je bila 300 ms, a korištena je točkasta apertura promjera 45 µm. Laser valne duljine 405 nm korišten je za pobuđivanje fluorescentne boje za DNA DAPI ili sekundarnog antitijela Alexa Fluor-405 F (upotrijebljenog za označavanje proteina LGN). Za pobuđivanje fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina korišten je laser valne duljine 488 nm, a laser valne duljine 561 nm upotrijebljen je za pobuđivanje fluorescencije sekundarnog antitijela Alexa Fluor-594 (iskorištenog za označavanje endogenog proteina NuMA odnosno Eg5).

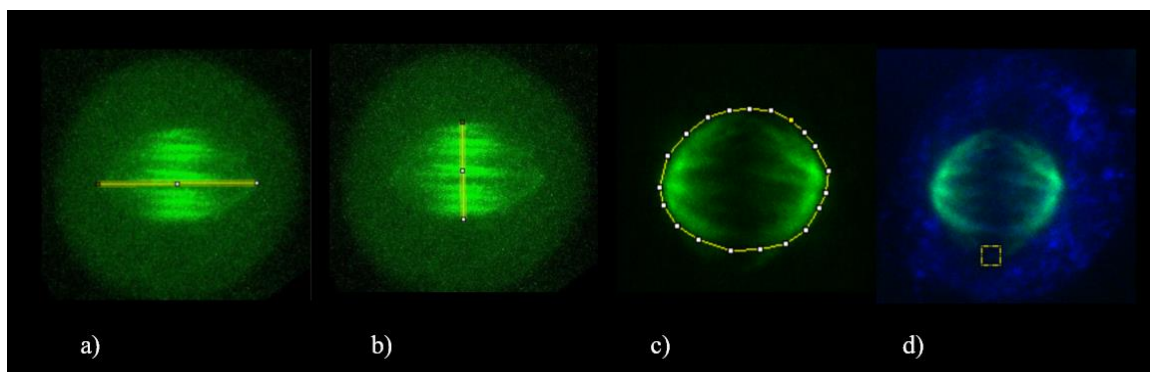
2.3.3. Aktivacija optogenetičkog sustava

Aktivacija optogenetičkog sustava napravljena je laserom valne duljine 488 nm. U svim eksperimentima snimano je 11 središnjih ravnina s razmakom između susjednih ravnina od 1 µm. Vrijeme ekspozicije iznosilo je 200 ms, a tijekom snimanja korištena je točkasta apertura veličine 60 µm. Postavke snimanja napravljene su tako da se laser valne duljine 488 nm pali svakih 10 s, a laser valne duljine 561 nm kojim se pobuđuje fluorescencija fuzijskog proteina NuMA-RFP-SspB svakih 60 s. Na taj način se omogućuje dovoljno česta aktivacija sustava

svjetlom i maksimalno smanjuje smanjivanje fluorescencije zbog izlaganja svjetlu (eng. *photobleaching*).

2.4. Analiza snimaka

Sve analize snimaka napravljene su u programu ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, US). Veličina piksela u svim slikama iznosila je 83 nm. Duljine diobenih vretena mjerene se pomoću alata *Straight line* tako da je povučena linija do vanjskih rubova polova. Istim alatom mjerene su i širine diobenog vretena na način da je linija povučena okomito na glavnu os diobenog vretena na mjestu gdje je ono najšire. Za određivanje intenziteta signala koji odgovara proteinima LGN, NuMA i Eg5 nakon imunofluorescencije korišten je alat *Polygon selections* tako da je označen prostor na slici koji zauzima diobeno vreteno. U svim snimkama nakon imunofluorescencije izmjeren je i intenzitet signala pozadine koji je dobiven je pomoću alata *Rectangle* tako da je uvijek ocrtan kvadrat duljine stranice 1,36 μm unutar stanice u blizini ekvatorijalne ravnine vretena i unutar stanice. Na slici 2.2. prikazani su primjeri opisanih mjerenja. Intenziteti signala za protein NuMA mjereni su na projekciji sume intenziteta središnjih pet ravnina, a za protein Eg5 središnjih devet ravnina. Za izražavanje ukupne količine signala unutar označenog prostora korištena je integrirana gustoća (eng. *integrated density*) koja predstavlja umnožak srednje vrijednosti intenziteta i proučavane površine. Dakle, ukupna količina signala u diobenom vretenu izračunata je kao razlika intenziteta signala na vretenu i intenziteta signala pozadine pomnožena s površinom diobenog vretena. Profili intenziteta signala za protein NuMA nakon imunofluorescencije napravljeni su u projekciji sume tri središnje ravnine diobenog vretena.

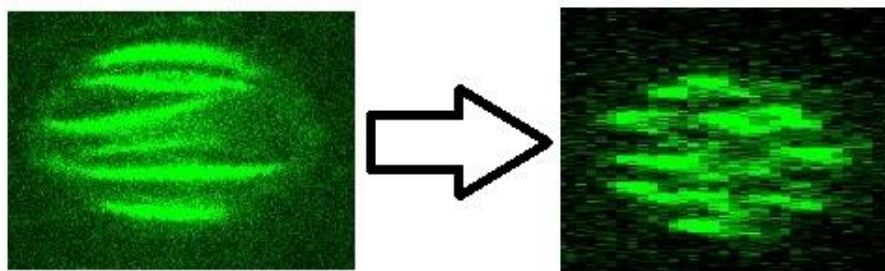


Slika 2.2. Primjeri mjerenja parametara na slikama dobivenim konfokalnom mikroskopijom. Na slici a) prikazan je način mjerenja duljine diobenog vretena, dok je na slici b) prikazan način mjerenja širine. Slika c) prikazuje način označavanja signala na diobenom vretenu nakon imunofluorescencije, a slika d) način mjerenja intenziteta signala pozadine.

Profili intenziteta signala za fuzijski protein NuMA-RFP-SspB i za protein iLID napravljeni su na projekcijama sume svih 11 snimljenih ravnina. Također je oduzet intenzitet signala pozadine određen na već opisani način. Napravljeni su profili intenziteta signala u nultoj minuti, točnije prije paljenja plavog lasera koji aktivira sustav, i zatim u prvoj, petoj i desetoj minuti aktivacije sustava.

2.4.1. Određivanje heliciteta vlakana u diobenom vretenu

Za analizu su korištene snimke živih stanica linije HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP i odabrane su samo one snimke metafaznih diobenih vretena u kojima su oba pola vretena vidljiva u istoj ravnini. Zatim su snimke vretena zarotirane u programu Fiji tako da je glavna os vretena približno paralelna x-osi. Nakon toga napravljena je transformacija tih horizontalno položenih diobenih vretena u vertikalna pomoću koda napisanog u programskom jeziku R (Slika 2.3.).



Slika 2.3. Snimka diobenog vretena dobivena konfokalnim mikroskopom prije i nakon transformacije u vertikalno vreteno. Zeleni signal odgovara signalu fuzioniranog proteina PRC1-GFP stabilno eksprimiranog u staničnoj liniji HeLa.

Kod je napisan tako da je osigurana rotacija bez zrcaljenja i uzete su u obzir aberacije uzrokovane razlikom u indeksu loma između imerzijskog ulja i vode u uzorku (korišten je korekcijski faktor). Kada se horizontalno položeno vreteno transformira u vertikalno, pojedina vlakna se vide kao točke u svakoj ravnini. Da bi se odredile koordinate tih točaka tj. vlakana korišten je alat *Multi-point tool* u programu ImageJ tako da su pojedinačna vlakna mikrotubula praćena ručno, označavanjem centra točkastog signala vlakna. Svako vlakno je praćeno od prve do posljednje ravnine u kojoj se signal može prepoznati kao pojedinačna točka, a određene su i koordinate polova. Za analizu su korištena samo vlakna u središnjem dijelu vretena. Pomoću uputa napisanih u programu MATLAB (MathWorks, Natick, SAD) koristeći koordinate polova i pojedinačnih vlakana izračunat je helicitet pojedinačnih vlakana kao prosječna promjena kuta u odnosu na udaljenost. Na kraju je izračunata prosječna vrijednost heliciteta svih vlakana unutar eksperimentalne skupine.

2.4.2. Izrada grafičkih prikaza i statistička obrada podataka

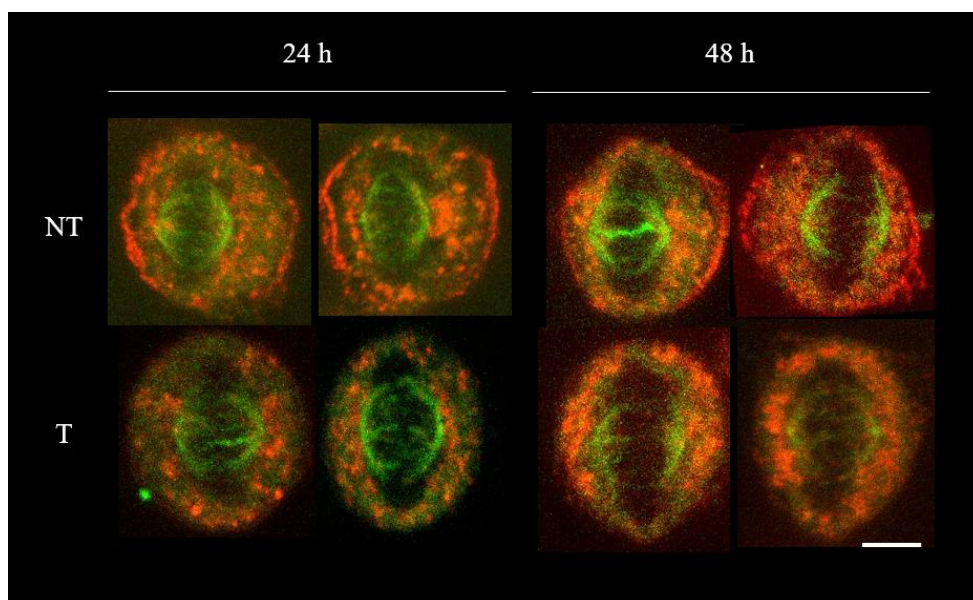
Grafički prikazi rezultata napravljeni su pomoću programa MATLAB tako da je svako mjerenje prikazano kao jedna točka, crnom linijom je označena srednja vrijednost mjerenja, a sivim pravokutnikom standardna pogreška srednje vrijednosti. Rezultati koji se međusobno statistički značajno razlikuju označeni su različitim slovima, dok su oni među kojima nema statistički značajne razlike označeni istim slovima. Za utvrđivanje je li razlika među rezultatima

statistički značajna korišteni su odgovarajući testovi u programu Statistica (StatSoft, Tulsa, SAD). U slučaju kada su uspoređene samo dvije skupine (za mjerenje kiralnosti diobenog vretena) korišten je t-test. Za uspoređivanje tri eksperimentalne skupine kod mjerenja količine signala proteina NuMA na diobenom vretenu nakon tretmana inhibitorima STLCi FCPT korišten je test *one-way* ANOVA (eng. analysis of variance). Statistička analiza ostalih eksperimenata koji su uključivali mjerenja za četiri eksperimentalne skupine koje su bile tretman specifičnom i kontrolnom siRNA tijekom 24 i 48 sati napravljena je testom *two-way* ANOVA. Za post-hoc analizu nakon testa ANOVA korišten je test Newman – Keuls. U svim statističkim testovima razina značajnosti iznosila je 0,05.

3. Rezultati

3.1. Utišavanje ekspresije proteina LGN pomoću siRNA

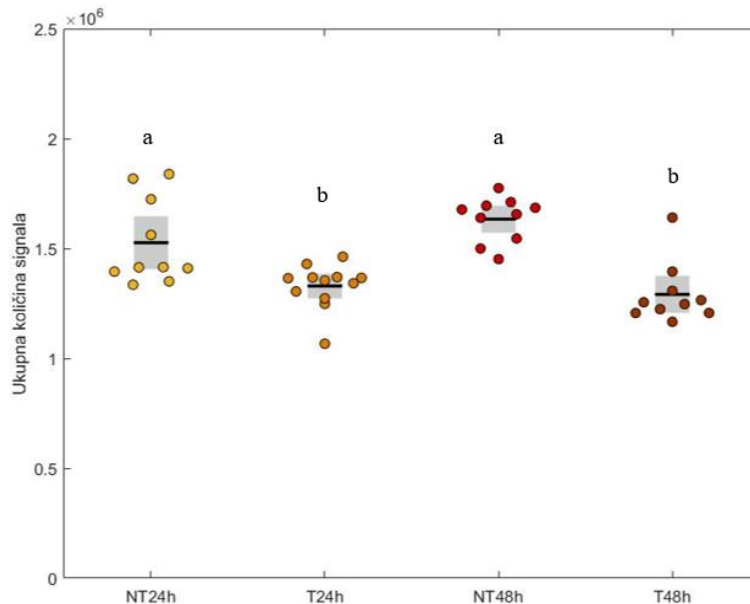
Kako protein LGN stvara interakcije s proteinom NuMA i ima iznimno važnu ulogu u pozicioniranju diobenog vretena u mitozu, u ovome radu je promatran učinak utišavanja njegove ekspresije u mitotskim stanicama linije HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP. Za utišavanje ekspresije proteina LGN korištena je metoda interferencije RNA pomoću siRNA, a kontrola utišavanja ekspresije bila je transfekcija stanica kontrolnom siRNA koja nema metu za utišavanje ekspresije u ljudskim stanicama. U svrhu potvrde utišavanja ekspresije proteina LGN napravljena je imunofluorescencija za taj protein 24 i 48 sati nakon transfekcije siRNA. Na slici 3.1. prikazane su stanice nakon tretmana siRNA koja cilja protein LGN snimljene konfokalnim mikroskopom. U svim eksperimentalnim skupinama možemo uočiti prisutnost velike količine signala proteina LGN u citoplazmi. U kontrolnim stanicama uočavamo jasan signal na membrani, osobito na dijelu membrane koji je bliži polovima. Za razliku od toga, u stanicama tretiranim specifičnom siRNA ne možemo uočiti oštar signal na membrani već je prisutan samo signal u citoplazmi.



Slika 3.1. Utišavanje ekspresije proteina LGN u mitotskim stanicama pomoću siRNA.

Korištena stanična linija je HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP čija lokalizacija je na slici prikazna zelenom bojom, dok je lokalizacija proteina LGN dobivena pomoću specifičnog antitijela prikazana crvenom bojom. Stanice su promatrane pod konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*), a brojke na vrhu slike trajanje tretmana. Mjerilo iznosi 5 μm .

Također, izmjerena je količina signala proteina LGN u stanicama te su na slici 3.2. grafički prikazani rezultati mjerenja. Može se primijetiti da je količina signala u stanicama tretiranim specifičnom siRNA manja nego u kontrolnim stanicama u tretmanu od 24 sata gdje je integrirana gustoća signala iznosila $(1,33 \pm 0,03) \times 10^6$ za stanice tretirane specifičnom siRNA, a $(1,53 \pm 0,06) \times 10^6$ za tretman kontrolnom. Do smanjenja količine signala je došlo i u tretmanu tijekom 48 sati sa specifičnom siRNA gdje je integrirana gustoća iznosila je $(1,29 \pm 0,03) \times 10^6$, u odnosu na tretman s kontrolnom siRNA s integriranom gustoćom od $(1,63 \pm 0,04) \times 10^6$.



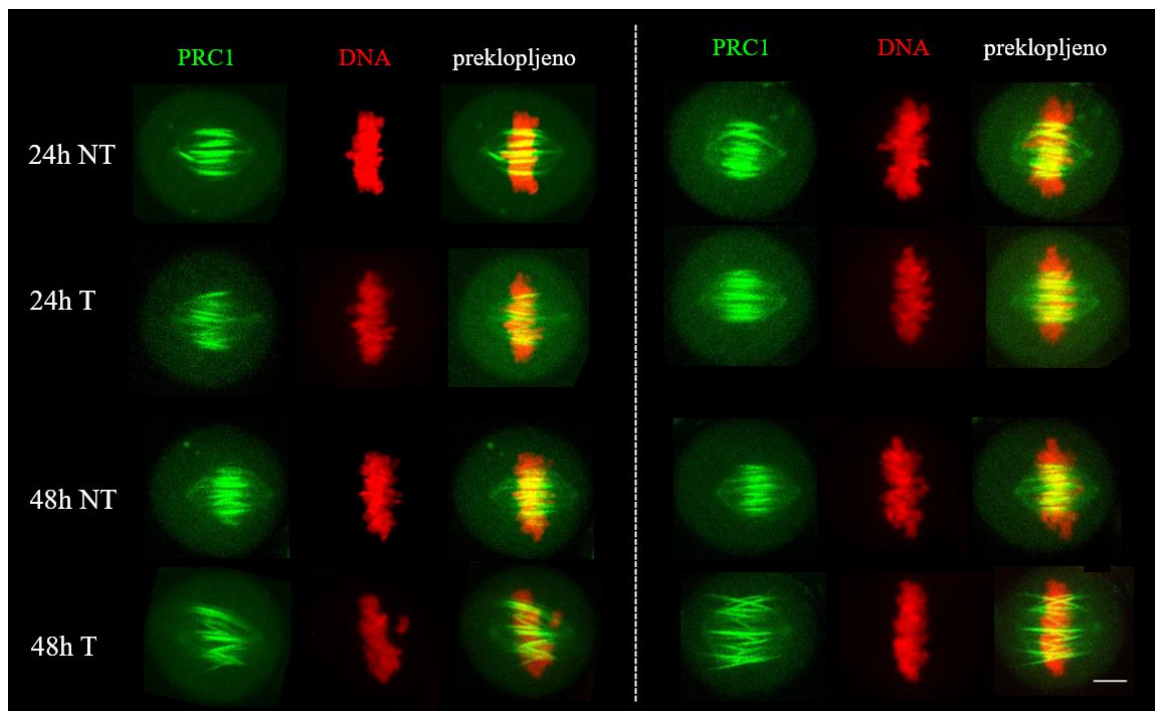
Slika 3.2. Analiza intenziteta signala proteina LGN u mitotskim stanicama nakon utišavanja njegove ekspresije. Svaka točka označava vrijednost ukupne količine signala za pojedinu stanicu unutar eksperimentalne skupine. U svakoj skupini analizirani su podaci dobiveni iz redom 10, 12, 10 i 10 stanica u dva nezavisna eksperimenta. Crna linija označava srednju vrijednost ukupne količine signala, a sivi pravokutnik standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Različitim slovima su označene skupine među kojima postoji statistički značajna razlika prema testu *two-way* ANOVA pri razini značajnosti $p < 0,05$. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*).

3.2. Učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na diobeno vreteno u živim stanicama

3.2.1. Arhitektura diobenog vretena nakon utišavanja ekspresije proteina LGN

Snimanjem živih stanica 24 i 48 sati nakon tretmana sa siRNA specifičnom za utišavanje ekspresije proteina LGN možemo primijetiti utjecaj tretmana na arhitekturu diobenog vretena (Slika 3.3.). U tretmanu od 24 h uočavamo metafazna diobena vretena čiji polovi nisu potpuno fokusirani, tj. pojedina vlakna mikrotubula ne prate uobičajene zaobljene konture već su potpuno ravna i “strše”. Ipak, neka diobena vretena nemaju stršeća vlakna i na prvi pogled djeluju normalno. Bez obzira na to jesu li polovi vretena potpuno fokusirani ili ne, kromosomi

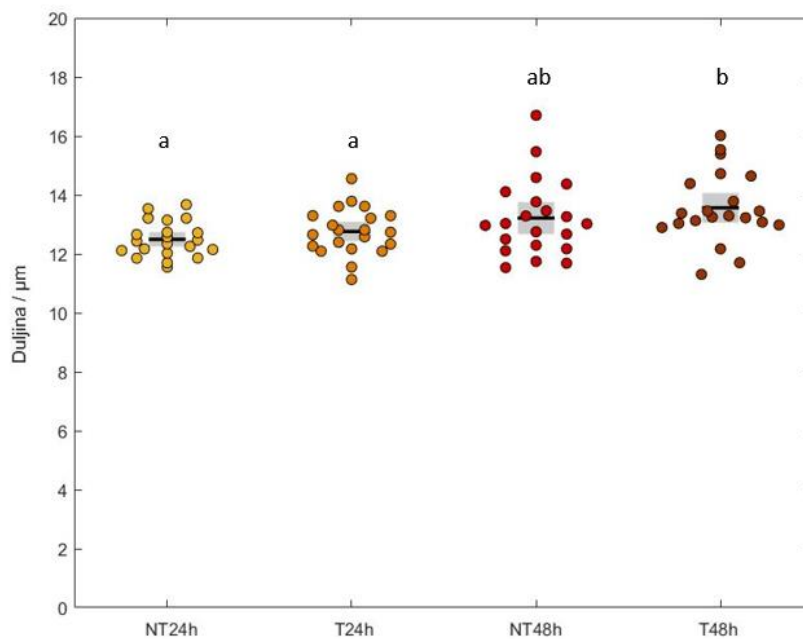
su u metafazi potpuno poravnati. U stanicama u kojima je tretman siRNA trajao 48 sati fenotip defokusiranih vretena postaje još izraženiji. Ne pojavljuju se samo pojedinačna ravna vlakna već ih ima mnogo u jednom diobenom vretenu. Iako arhitektura takvih diobenih vretena izgleda jako poremećeno, kromosomi u metafazi su potpuno poravnati. Diobena vretena u stanicama tretiranim kontrolnom siRNA tijekom 24 i 48 sati imala su normalnu arhitekturu. Također, opaženo je da prilikom snimanja jednakog trajanja u tretmanu specifičnom siRNA od 24 sata došlo do povećanja broja multipolarnih vretena oko 2,5 puta, a u tretmanu od 48 sati oko 6 puta u odnosu na kontrolu.



Slika 3.3. Žive stanice nakon tretmana siRNA za protein LGN. Korištena je stanična linija HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP koji je na slici prikazan zelenom bojom, dok je DNA vizualizirana pomoću boje SiR-DNA i prikazana crvenom bojom. Stanice su promatrane pod konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*). Mjerilo iznosi 5 μm .

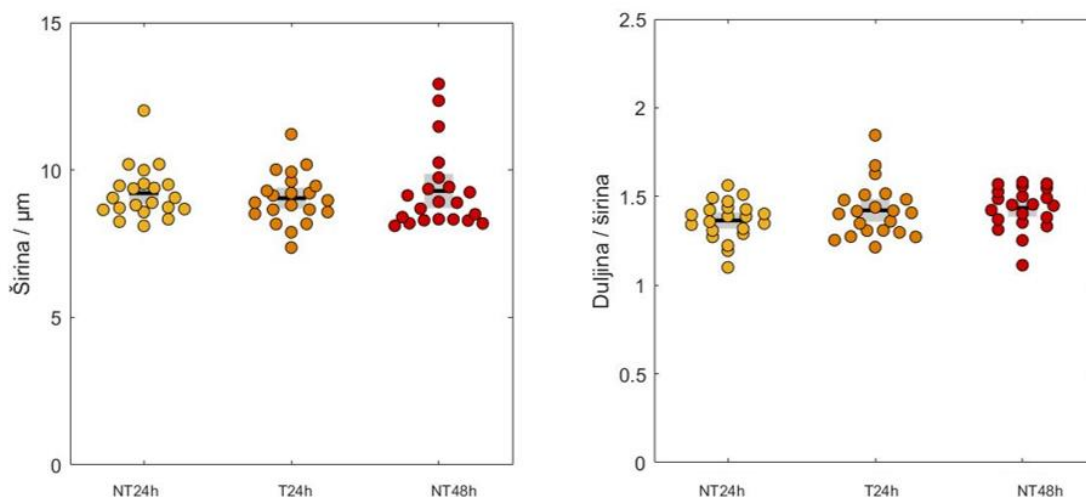
U stanicama koje su tretirane siRNA tijekom 24 i 48 sati izmjerene su duljine diobenih vretena (Slika 3.4.). Tretmani siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN nakon 24 i nakon 48 sati dovode do blagog povećanja duljine diobenog vretena u odnosu na kontrolu koje nije statistički značajno prema testu *two-way* ANOVA uz razinu značajnosti $p < 0,05$. Prosječna duljina

vretena nakon tretmana specifičnom siRNA tijekom 24 sata iznosila je $12,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$, a kontrolnom $12,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$. U tretmanu tijekom 48 sati vrijednosti prosječne duljine iznosile su $13,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ za tretman specifičnom, odnosno $13,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ za tretman kontrolnom siRNA. Širine vretena izmjerene su za sve stanice osim onih koje su tretirane specifičnom siRNA tijekom 48 sati zbog toga što je njima bilo teško dosljedno odrediti širinu diobenog vretena (bila su iznimno defokusirana). Nije zabilježena statistički značajna promjena u širini diobenog vretena između eksperimentalnih skupina. Također, izračunat je omjer duljine i širine vretena koji se isto tako ne razlikuje značajno među skupinama. Grafički prikaz je na slici 3.5.



Slika 3.4. Duljine diobenih vretena nakon tretmana stanica sa siRNA za protein LGN.

Duljine diobenih vretena su analizirane u živim stanicama HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP nakon snimanja konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Svaka točka označava duljinu vretena u jednoj stanici, a u svakoj skupini izmjerena su vretena u redom 22, 21, 21 i 20 stanica iz tri nezavisna eksperimenta. Crna linija označava srednju vrijednost duljine, a sivi pravokutnik standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Različitim slovima su označene skupine među kojima postoji statistički značajna razlika prema testu *two-way* ANOVA pri razini značajnosti $p < 0,05$. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*).

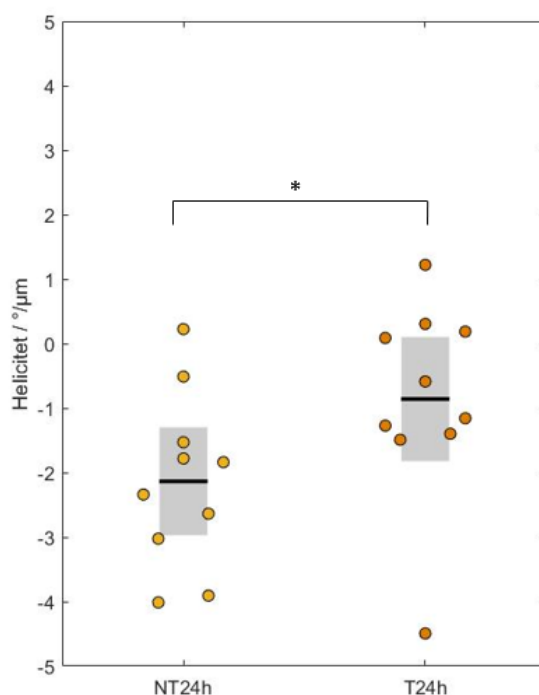


Slika 3.5. Širine diobenih vretena te omjer duljine i širine nakon tretmana stanica s LGN siRNA. Dimenzije diobenih vretena su analizirane u živim stanicama HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP nakon snimanja konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Svaka točka označava širinu vretena u jednoj stanici na lijevom grafičkom prikazu, odnosno omjer duljine i širine vretena za pojedinu stanicu na desnom. Podaci su dobiveni iz dva nezavisna eksperimenta a po eksperimentalnoj skupini analizirano je redom 21, 20 i 21 stanica. Crna linija označava srednju vrijednost ukupne količine signala, a sivi pravokutnik standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Među skupinama nije bilo statistički značajne razlike prema testu *two-way* ANOVA i razini značajnosti $p < 0,05$. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*).

3.2.2. Helicitet vlakana mikrotubula nakon utišavanja ekspresije proteina LGN

Kiralnost diobenog vretena kao posljedica heliciteta vlakana mikrotubula je njegovo novootkriveno svojstvo. Utišavanje ekspresije proteina LGN korišteno je kako bi se istražilo utječu li sile koje djeluju sa staničnog korteksa na diobeno vreteno preko astralnih mikrotubula na helicitet svežnjeva u diobenom vretenu. Za mjerenje heliciteta mikrotubula u stanicama tretiranim siRNA korištene su samo one koje su tretirane tijekom 24 h jer su stanice tretirane tijekom 48 sati imale previše stršećih vlakana koje je bilo teško pratiti nakon transformacije horizontalnog diobenog vretena u vertikalno. Također, u stanicama tretiranim siRNA

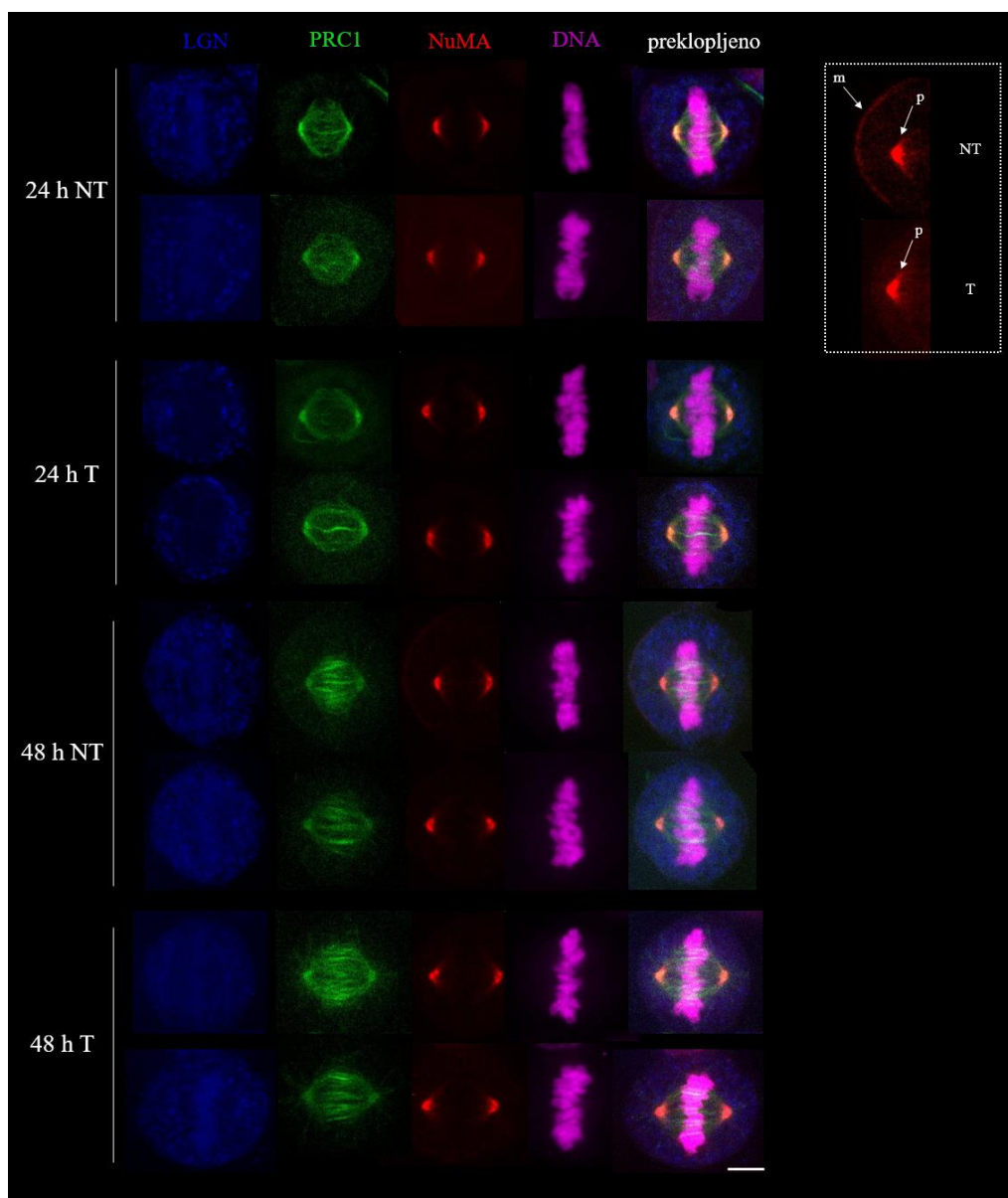
specifičnom za utišavanje ekspresije proteina LGN tijekom 24 h izabrana su ona diobena vretena koja nisu imala stršeća vlakna. Iako su takva diobena vretena izgledala kao i ona tretirana kontrolnom siRNA u originalnim snimkama gdje su horizontalno položena, helicitet njihovih mikrotubula se statistički značajno smanjio u odnosu na kontrolne prema t-testu uz razinu značajnosti $p < 0,05$. Negativne vrijednosti označavaju lijevi helicitet. Rezultati mjerenja heliciteta mikrotubula u stanicama nakon tretmana siRNA tijekom 24 sata prikazani su na slici 3.6. Prosječni helicitet vretena nakon tretmana specifičnom siRNA iznosio je $-0,9 \pm 0,1$ $^{\circ}/\mu\text{m}$, a kontrolnom $-2,1 \pm 0,1$ $^{\circ}/\mu\text{m}$.



Slika 3.6. Helicitet vlakana mikrotubula u stanicama nakon tretmana siRNA za protein LGN. Ekspresija proteina LGN utišana je pomoću siRNA u stanicama HeLa sa stabilnom ekspresijom proteina fuzijskog PRC1-GFP korištenog za mjerenje heliciteta pomoću konfokalnog fluorescencijskog mikroskopa. Svaka točka označava srednji helicitet vlakana mikrotubula vretena u jednoj stanici., a po svakoj skupini analiziran je prosječni helicitet 10 stanica iz dva nezavisna eksperimenta. Crna linija označava srednju vrijednost heliciteta, a sivi pravokutnik standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Postoji statistički značajna razlika među ispitivanim skupinama prema t-testu uz razinu značajnosti $p < 0,05$ što je označeno jednom zvjezdicom. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*). U NT stanicama analizirano je ukupno 180, a u T 177 vlakana mikrotubula.

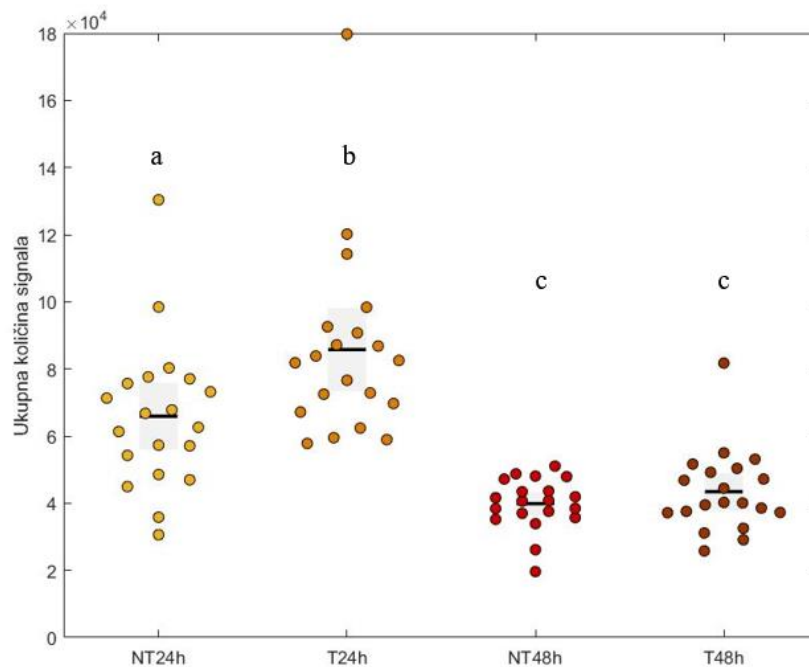
3.3. Učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na lokalizaciju proteina NuMA

Da bi se utvrdio učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na lokalizaciju proteina NuMA u stanicama u metafazi napravljena je metoda imunofluorescencije za proteine LGN i NuMA. Na slici 3.7. prikazane su fotografije stanica nakon provedene imunofluorescencije dobivene konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. U nekim kontrolnim metafaznim stanicama se može uočiti signal proteina NuMA na staničnoj membrani u blizini polova koji je iznimno slab, dok se u drugima takav signal ne primjećuje. S druge strane, u stanicama gdje je utišana ekspresija proteina LGN nisu zabilježene stanice koje imaju signal proteina NuMA na membrani. To se može primijetiti na slikama na kojima je pojačan kontrast što je prikazano na odsječku desno na slici 3.7. Kontrast je na obje slike u isječku podešen jednako. Osim toga, na slikama nije uočena razlika u lokalizaciji proteina NuMA na polovima.



Slika 3.7. Imunofluorescencija proteina NuMA i LGN nakon utišavanja ekspresije proteina LGN pomoću siRNA. Korištena je stanična linija HeLa sa stabilnom ekspresijom proteina PRC1-GFP koji je na slici prikazan zelenom bojom. Plavom bojom prikazana je lokalizacija proteina LGN dobivena pomoću specifičnog antitijela, a crvenom bojom lokalizacija proteina NuMA. DNA je vizualizirana pomoću boje SiR-DNA i na slici prikazana ružičastom bojom. U gornjem desnom kutu prikazan je isječak slike stanice s pojačanim kontrastom. Slika je dobivena pomoću konfokalnog fluorescencijskog mikroskopa. Strelicom i slovom m označen je signal proteina NuMA na membrani, a slovom p na polovima. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*). Mjerilo iznosi 5 μ m.

Ipak, kada je izmjerena količina signala proteina NuMA na diobenom vretenu utvrđeno je da je u tretmanu od 24 sata došlo do statistički značajnog povećanja signala u stanicama u kojima je utišana ekspresija proteina LGN. U tretmanu siRNA tijekom 48 sati zabilježen je pad signala u obje skupine u odnosu na tretman tijekom 24 sata. Iako je u tretmanu od 48 sati količina signala proteina NuMA u stanicama s utišanom ekspresijom proteina LGN veća nego u kontrolnim stanicama, ovdje ta razlika nije statistički značajna. Za utvrđivanje statističke značajnosti korišten je test *two-way* ANOVA uz razinu značajnosti $p < 0,05$. Na slici 3.8. nalazi se grafički prikaz rezultata mjerenja količine signala proteina NuMA u metafaznom diobenom vretenu (integrirana gustoća za tretman 24 sata: specifična siRNA $(8,6 \pm 0,6) \times 10^4$, kontrolna siRNA $(6,6 \pm 0,5) \times 10^4$; za tretman 48 sati: specifična siRNA $(4,3 \pm 0,3) \times 10^4$, kontrolna siRNA $(4,0 \pm 0,2) \times 10^4$).

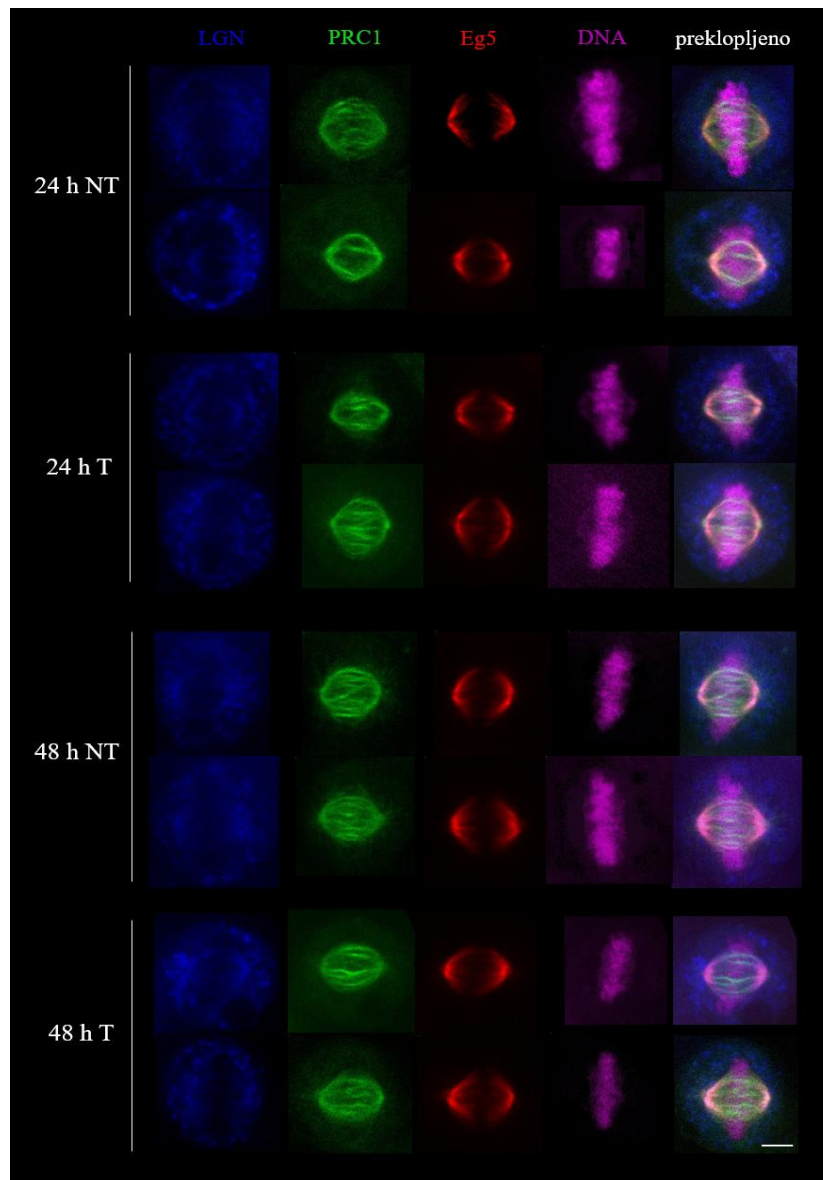


Slika 3.8. Količina proteina NuMA na diobenom vretenu nakon utišavanja ekspresije proteina LGN pomoću siRNA. Količina signala je izmjerena u stanicama HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP nakon imunofluorescentnog bojanja za protein NuMA i LGN te snimanja konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Svaka točka označava ukupnu količinu signala za protein NuMA u jednoj stanici, a svaka eksperimentalna skupina ima redom 20, 20, 19 i 20 mjerenja iz dva nezavisna eksperimenta. Crna linija označava srednju vrijednost ukupne količine signala, a sivi pravokutnik standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Različitim slovima su označene skupine među kojima postoji statistički značajna razlika prema testu *two-way* ANOVA pri razini značajnosti $p < 0,05$. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*).

3.4. Učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na lokalizaciju proteina Eg5

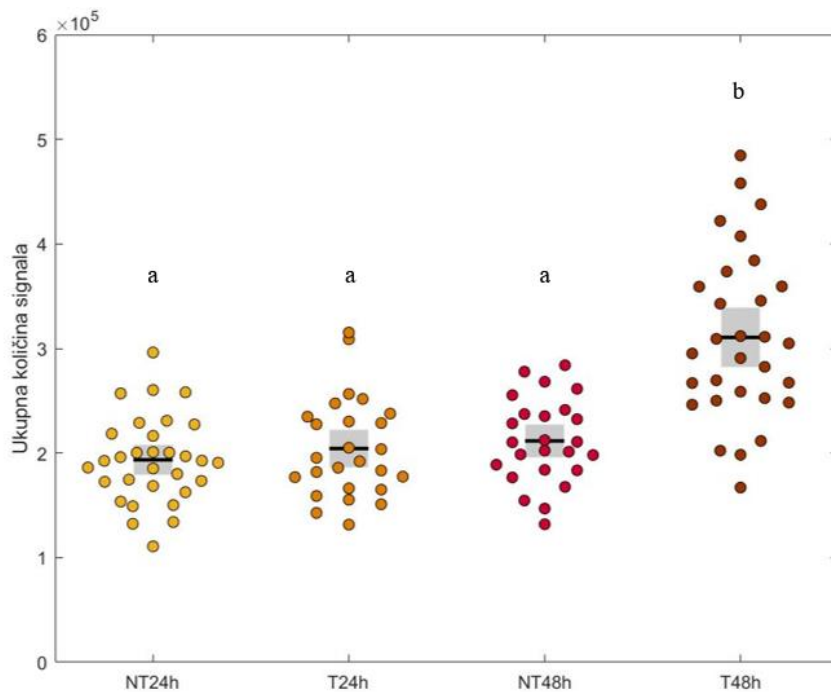
Metoda imunofluorescencije također je korištena za određivanje utjecaja utišavanja ekspresije proteina LGN na lokalizaciju motornog proteina Eg5, koristeći antitijela specifična za LGN i Eg5. Fotografije dobivene pomoću konfokalnog mikroskopa nakon provedene imunofluorescencije prikazane su na slici 3.9. Promatrajući dobivene snimke ne može se uočiti

promjena u lokalizaciji proteina Eg5, koji se u stanicama svih eksperimentalnih skupina nalazi duž mikrotubula na diobenom vretenu u metafazi, s time da je izraženija njegova prisutnost u blizini polova.



Slika 3.9. Imunofluorescencija proteina Eg5 i LGN nakon utišavanja ekspresije proteina LGN pomoću siRNA. Korištene su stanice linije HeLA sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP koji je na slici prikazan zelenom bojom. Lokalizacija proteina LGN i Eg5 dobivena je pomoću njihovih specifičnih antitijela i prikazana plavom, odnosno crvenom bojom. DNA je vizualizirana bojom SiR-DNA i prikazana ružičastom bojom. Stanice su snimljene konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*). Mjerilo iznosi 5 μ m.

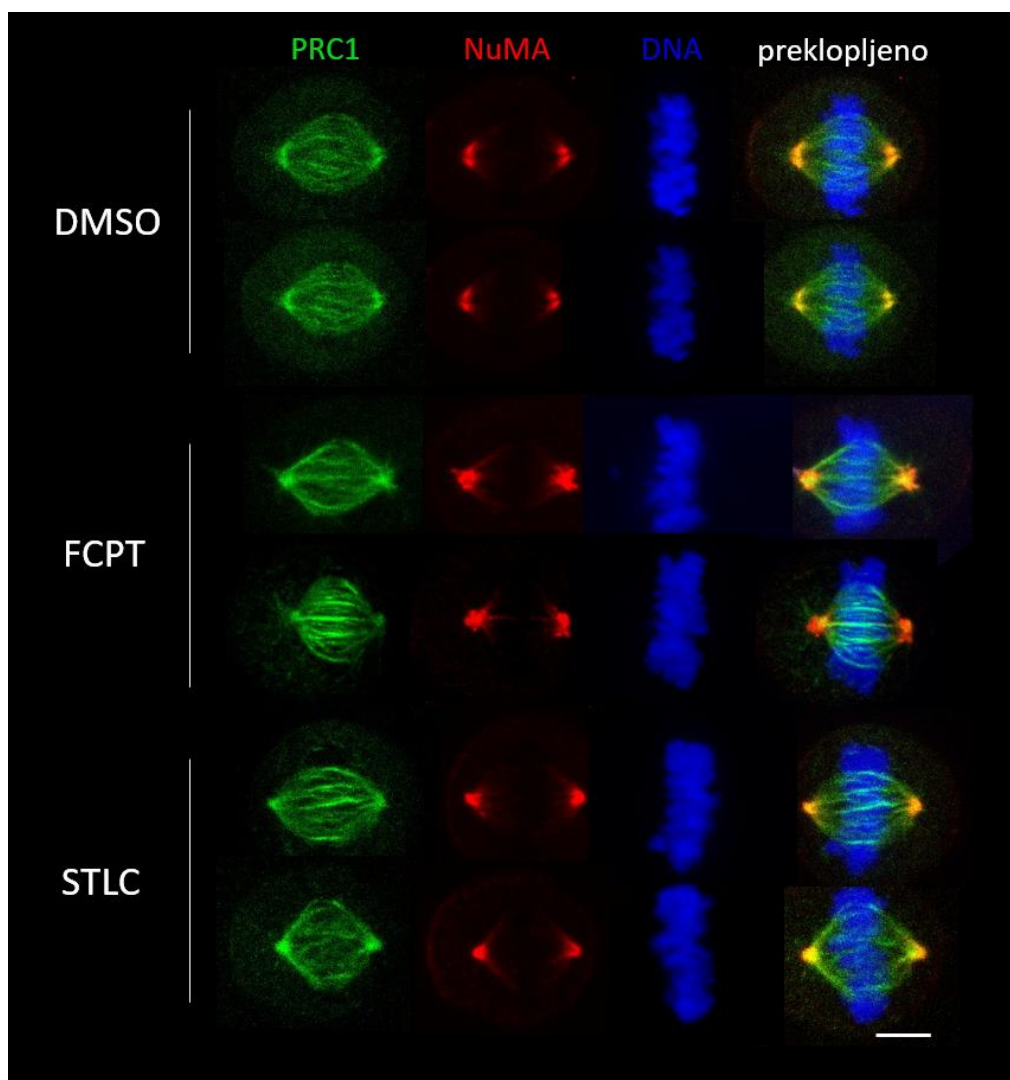
Napravljena je i analiza ukupne količine signala proteina Eg5 u diobenom vretenu nakon tretmana molekulama siRNA, a grafički prikaz je na slici 3.10. (integrirana gustoća za tretman 24 sata: specifična siRNA $(2,04 \pm 0,09) \times 10^5$ kontrolna siRNA $(1,93 \pm 0,07) \times 10^5$; za tretman 48 sati: specifična siRNA $(3,11 \pm 0,14) \times 10^5$, kontrolna siRNA $(2,12 \pm 0,08) \times 10^5$). U tretmanu siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN tijekom 48 sati došlo je do statistički značajnog povećanja količine signala proteina Eg5 u diobenom vretenu u odnosu na sve ostale eksperimentalne skupine. Vrijednosti količine signala u vretenu u stanicama ostalih eksperimentalnih skupina se međusobno ne razlikuju statistički značajno.



Slika 3.10. Količina kinezina Eg5 na diobenom vretenu nakon utišavanja ekspresije proteina LGN pomoću siRNA. U stanicama HeLa utišana je ekspresija LGN. Diobeno vreteno se može vizualizirati zbog ekspresije fuzijskog proteina PRC1-GFP promatrane pod fluorescencijskim mikroskopom. Lokalizacija proteina LGN i Eg5 dobivena je pomoću njihovih specifičnih antitijela Svaka točka označava ukupnu količinu signala za protein Eg5 u jednoj stanici, a za svaku eksperimentalnu skupinu korišteno je redom 31, 26, 25 i 30 stanica iz dva nezavisna eksperimenta. Crna linija označava srednju vrijednost ukupne količine signala, a sivi pravokutnik standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Različitim slovima su označene skupine među kojima postoji statistički značajna razlika prema testu *two-way* ANOVA uz razinu značajnosti $p < 0,05$. NT označava stanice tretirane kontrolnom siRNA (eng. *non-targeting*), a T stanice tretirane siRNA specifičnom za utišavanje proteina LGN (eng. *targeting*).

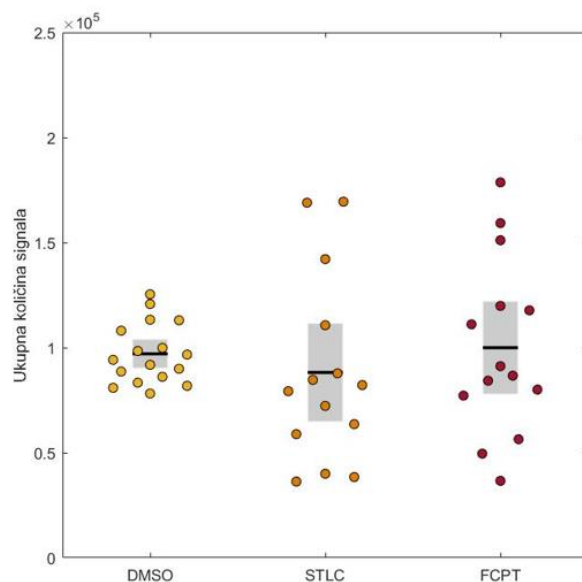
3.5. Djelovanje inhibitora motorne aktivnosti proteina Eg5 na lokalizaciju proteina NuMA

Kako bi se utvrdio učinak kinezina Eg5 na lokalizaciju proteina NuMA, stanice su tretirane inhibitorima motorne aktivnosti STLC i FCPT nakon čega je protein NuMA detektiran metodom imunofluorescencije. Stanice su fiksirane nakon djelovanja inhibitora u trajanju od 30 minuta. Djelovanje oba inhibitora bilo je potvrđeno povećanim udjelom monopolarnih vretena što je posljedica nemogućnosti razdvajanja polova inhibicijom motornog proteina Eg5. Ipak, postojale su i stanice s bipolarnim metafaznim vretenima, a primjeri su prikazani na slici 3.11. Za kontrolu tretmana inhibitorima STLC i FCPT korišten je DMSO u kojem su otopljeni ovi inhibitori. Vretena i lokalizacija proteina NuMA u kontrolnim stanicama izgledala su normalno. Iako protein NuMA u tretmanu inhibitorima STLC i FCPT nalazimo na polovima vretena, oba tretmana su uzrokovala promjenu oblika signala. U tretmanu s FCPT možemo primijetiti da signal proteina NuMA poprima nepravilan oblik, dok polovi vretena u tretmanu sa STLC postaju jače fokusirani.



Slika 3.11. Analiza metafaznog diobenog vretena stanica nakon tretmana inhibitorima STLC i FCPT. Tretman s DMSO je kontrolni tretman. Korištena je stanična linija HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP koji je na slici prikazan zelenom bojom. Crvenom bojom prikazana je lokalizacija proteina NuMA dobivena pomoću specifičnog antitijela. DNA je vizualizirana bojom DAPI i prikazana plavom bojom. Stanice su snimljene konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Mjerilo iznosi 5 μm .

S druge strane, iako je uočena promjena u obliku signala proteina NuMA, u količini signala nije bilo statistički značajne razlike među eksperimentalnim skupinama. Integrirana gustoća za tretman inhibitorom STLC iznosila je $(0,9 \pm 0,1) \times 10^5$, za tretman s FCPT $(1,0 \pm 0,1) \times 10^5$, a za kontrolu $(1,0 \pm 0,03) \times 10^5$. Na slici 3.12. je grafički prikaz mjerenja količine signala proteina NuMA na diobenom vretenu u stanicama tretiranim inhibitorima Eg5 STLC i FCPT te kontroli tretiranoj s DMSO.



Slika 3.12. Protein NuMA na diobenom vretenu nakon tretmana inhibitorima motorne aktivnosti Eg5. Protein NuMA detektiran je u stanicama imunofluorescencijom pomoću specifičnog antitijela, a diobeno vreteno vizualizirano fluorescencijom rekombinantnog proteina PRC1-GFP stabilno eksprimiranog u stanicama HeLa. Stanice su snimljene konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Svaka točka označava ukupnu količinu signala za protein NuMA u jednoj stanici (u svakoj skupini ih je redom 16, 14 i 14 iz jednog eksperimenta). Crna linija označava srednju vrijednost ukupne količine signala, a sivi pravokutnik standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Među ispitivanim skupinama nema statistički značajne razlike prema testu *one-way* ANOVA uz razinu značajnosti $p < 0,05$. DMSO označava stanice tretirane s DMSO (kontrolu), STLC stanice tretirane inhibitorom STLC, a FCPT stanice tretirane inhibitorom FCPT.

3.6. Uspostava optogenetičkog sustava za protein NuMA

Drugi cilj ovog diplomskog rada bio je razviti optogenetički sustav za protein NuMA koji bi trebao omogućiti njegovo brzo i reverzibilno uklanjanje s diobenog vretena u svrhu boljeg razumijevanja njegove funkcije u metafazi mitoze. Da bi se uspostavio optogenetički sustav u stanici potrebno je transficirati stanice optogenetičkim plazmidom i plazmidom iLID. U ovome radu optogenetički plazmid za protein NuMA konstruiran je na dva načina: ugradnjom kodirajućeg slijeda za RFP-SspB u vektor u kojem se nalazi kodirajući slijed za protein NuMA te ugradnjom kodirajućeg slijeda za protein NuMA u vektor u kojem je slijed za RFP-SspB.

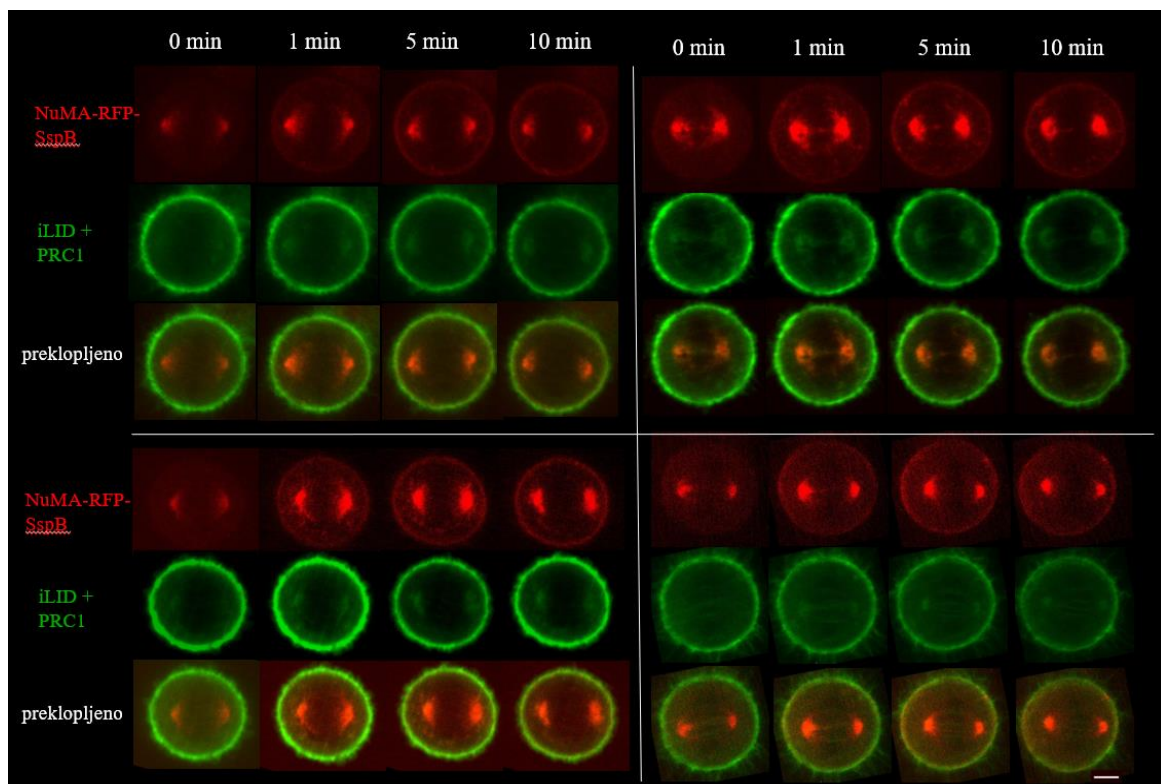
Oba tipa plazmida su uspješno konstruirana što je potvrđeno sekvenciranjem i zatim su transficirana u stanice linije HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP. Transfekcija konstruiranog plazmida dobivenog ugradnjom kodirajućeg slijeda za protein NuMA u plazmid u kojem se nalazi slijed za RFP-SspB dovela je do ekspresije fuzijskog proteina koji je detektiran konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom, međutim njegova lokalizacija u stanicama u interfazi nije bila u jezgri već u citoplazmi. Fuzijski protein eksprimiran s plazmida dobivenog drugim pristupom (ugradnja kodirajućeg slijeda za RFP-SspB u vektor u kojem se nalazi kodirajući slijed za protein NuMA) imao je normalnu lokalizaciju u stanicama: u stanicama u interfazi nalazio se u jezgri, a u stanicama u diobi na polovima vretena. Za uspostavu optogenetičkog sustava korišten je tako konstruirani plazmid. Prilikom kotransfekcije konstruiranog plazmida i plazmida iLID, povoljna ekspresija fuzijskog proteina NuMA-RFP-SspB bila je prisutna samo u stanicama u kojima je protein iLID eksprimiran u većoj mjeri.

3.6.1. Funkcioniranje optogenetičkog sustava za protein NuMA

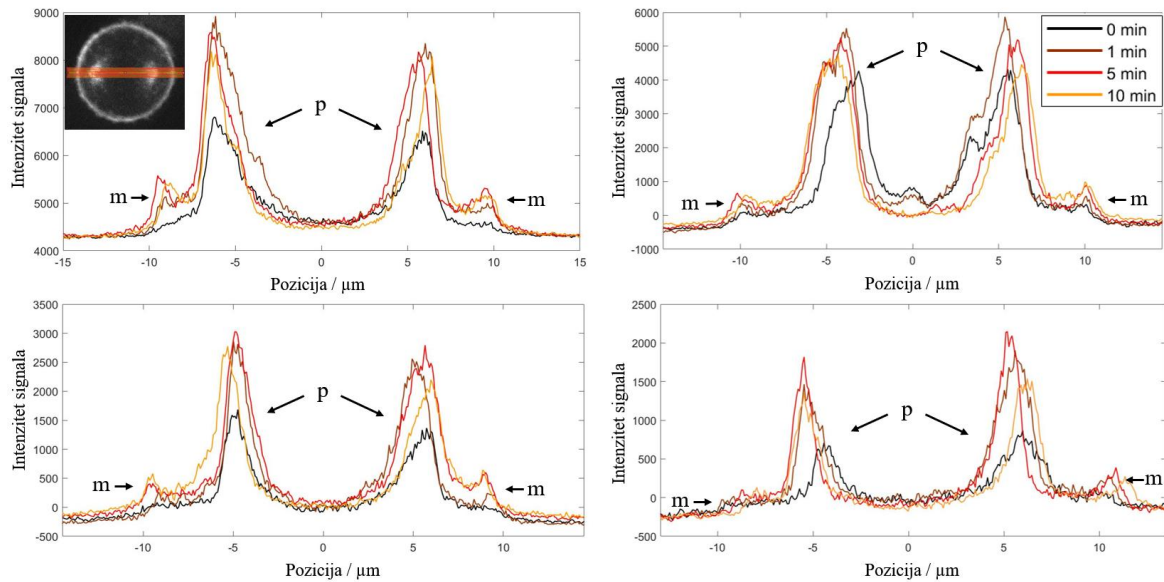
Da bi optogenetički sustav mogao funkcionirati, potrebna je ekspresija fuzijskog proteina NuMA-RFP-SspB i proteina iLID u istoj stanici te aktivacija sustava pomoću plavog lasera valne duljine 488 nm. Postavke za aktivaciju sustava su bile takve da se plavi laser palio svakih 10 sekundi, dok se laser za vizualizaciju fuzijskog proteina NuMA-RFP-SspB palio svaku minutu, s time da je prvi puta upaljen prije paljenja plavog svjetla da se utvrdi lokalizacija fuzijskog proteina prije aktivacije sustava. Na slici 3.13. prikazane su četiri stanice u kojima je uspostavljen optogenetički sustav dobivene snimljene konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Prikazane su u četiri vremenske točke: u nultoj (prije aktivacije sustava), prvoj, petoj i desetoj minuti. Na slikama se može primijetiti da nakon aktivacije sustava dolazi do povećanja signala NuMA-RFP-SspB na staničnoj membrani, međutim, ne može se utvrditi njegovo uklanjanje s polova. Također se može primijetiti da se povećava intenzitet NuMA-RFP-SspB i na polovima. Osim toga, dolazi do pojave i povećanja intenziteta zelenog signala (vizualizacija laserom valne duljine 488 nm) na polovima diobenog vretena što najvjerojatnije odgovara proteinu iLID. Iako prikazane stanice imaju stabilnu ekspresiju proteina PRC1-GFP, on se vrlo slabo uočava.

Na slici 3.14. nalazi se grafički prikaz profila intenziteta signala fuzijskog proteina NuMA-RFP-SspB za četiri stanice koje su prikazane na slici 3.13. Kao i fotografije, profili pokazuju

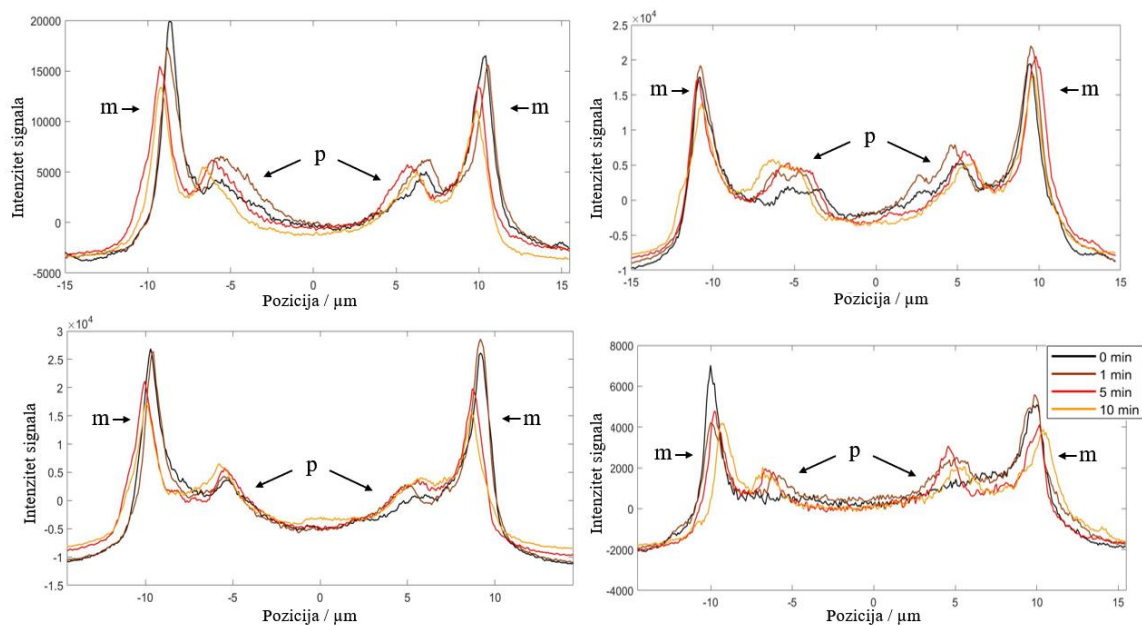
da aktivacijom sustava dolazi do pojave fuzijskog proteina na membrani, no većina ipak ostaje na polovima. Također dolazi do povećanja intenziteta signala i na polovima nakon paljenja plavog lasera. Na slici 3.15. nalazi se grafički prikaz profila intenziteta signala dobivenog pobuđivanjem fluorescencije laserom valne duljine 488 nm, za iste četiri stanice. Iako se tom valnom duljinom pobuđuje i fluorescencija fuzijskog proteina PRC1-GFP, čini se da je ona zanemariva u odnosu na fluorescenciju proteina iLID. Tako se na profilima intenziteta jasno može vidjeti povećanje intenziteta na području polova diobenog vretena, kao što je vidljivo i na fotografijama.



Slika 3.13. Optogenetički sustav za protein NuMA. Na slici su prikazane snimke četiri različite stanice linije HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP u kojima je uspostavljen sustav transfekcijom plazmida sa sekvencama za proteine NuMA-RFP-SspB i iLID. Snimke različitih stanica međusobno su odvojene bijelim linijama. Svaka stanica je snimljena u nultoj, prvoj, petoj i desetoj minuti aktivacije optogenetičkog sustava pod fluorescencijskim mikroskopom. Crvenom bojom prikazana je lokalizacija fuzijskog proteina NuMA-RFP-SspB, a zelenom iLID i PRC1-GFP. Mjerilo iznosi 5 μ m.

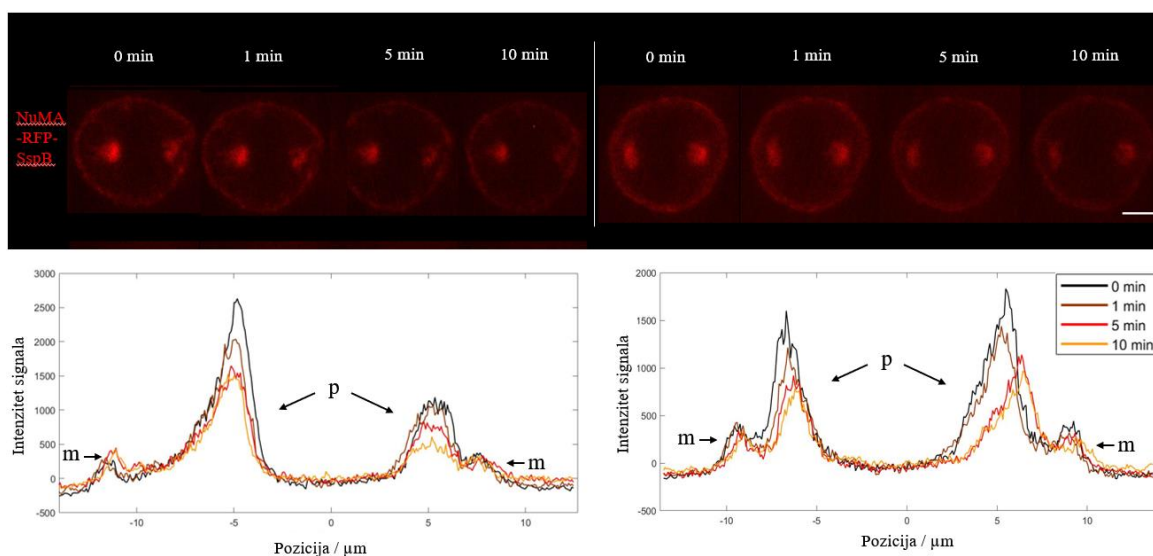


Slika 3.14. Profili intenziteta signala za NuMA-RFP-SspB. Profili odgovaraju stanicama na slici 3.13. linije HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP u kojima je uspostavljen optogenetički sustav ubacivanjem plazmida koji kodiraju proteine NuMA-RFP-SspB i iLID. Legenda u gornjem desnom kutu vrijedi za sve grafičke prikaze. U gornjem lijevom kutu je fotografija na kojoj je prikazano na koji način je označena linija profila intenziteta. Strelicom i slovom m označen je intenzitet signala koji odgovara signalu na staničnoj membrani, a slovom p na polovima diobenog vretena.



Slika 3.15. Profili intenziteta signala za iLID. Profili odgovaraju stanicama na slici 3.13. linije HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP u kojima je uspostavljen optogenetički sustav ubacivanjem plazmida koji kodiraju proteine NuMA-RFP-SspB i iLID. U kanalu za iLID (pobuđevanje fluorescencije laserom valne duljine 488 nm) snimljen je i signal za fuzijski protein PRC1-GFP, ali njegov intenzitet je zanemariv. Legenda u donjem desnom kutu vrijedi za sve grafičke prikaze, a način označavanja linije intenziteta signala isti je kao i za sliku 3.14. Strelicom i slovom m označen je intenzitet signala koji odgovara signalu na staničnoj membrani, a slovom p na polovima diobenog vretena.

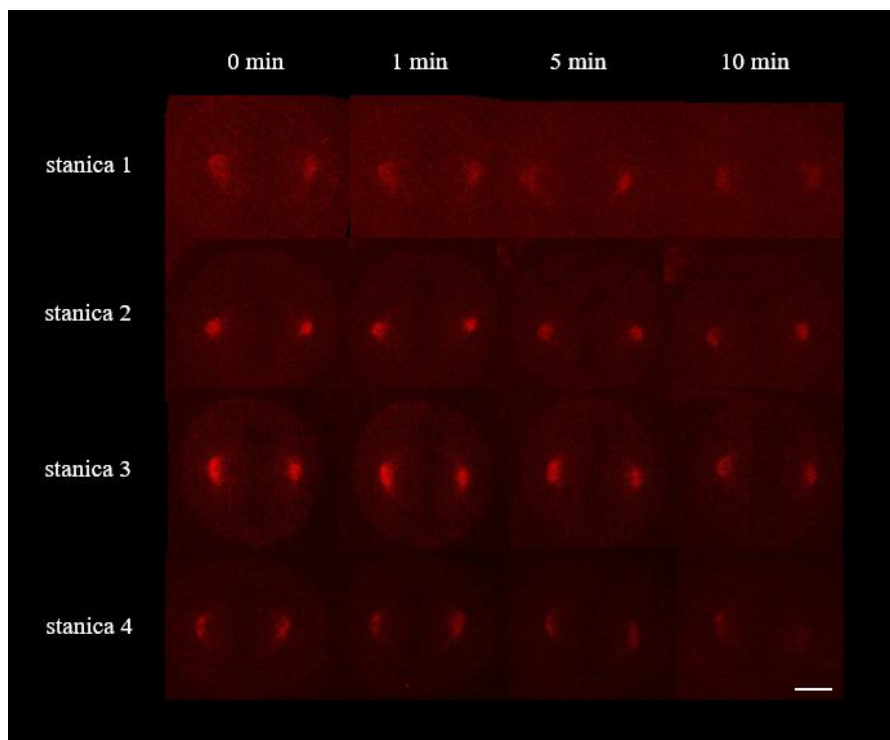
Kako bi se utvrdilo je li promjena lokalizacije proteina NuMA-RFP-SspB u optogenetičkom sustavu reverzibilna, snimanje stanica je nastavljeno nakon aktivacije sustava, ali bez uključivanja plavog lasera. Na slici 3.16. prikazane su slike dvije stanice u nultoj, prvoj, petoj i desetoj minuti nakon gašenja lasera valne duljine 488 nm te odgovarajući grafički prikaz profila intenziteta signala proteina NuMA-RFP-SspB. Može se primijetiti da signal fuzijskog proteina ostaje na membrani, te da se signal na membrani kao i na polovima vremenom smanjuje.



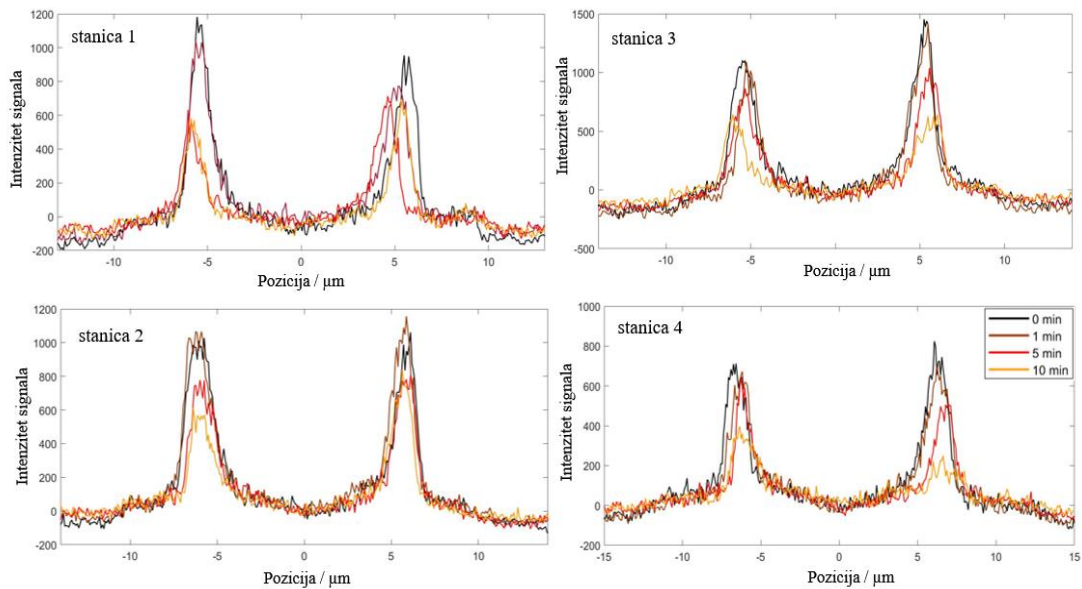
Slika 3.16. Fluorescencija i odgovarajući profili intenziteta za NuMA-RFP-SspB u dvije stanice prilikom gašenja plavog lasera nakon aktivacije optogenetičkog sustava. Korištena je stanična linija HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP u koju su uneseni plazmidi za stvaranje optogenetičkog sustava: NuMA-RFP-SspB i iLID. Stanice su snimljene konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Različite stanice su odvojene bijelom linijom, a snimljene su u nultoj, prvoj, petoj i desetoj minuti nakon gašenja aktivacijskog lasera. Crvenom bojom prikazana je lokalizacija fuzijskog proteina NuMA-RFP-SspB. Mjerilo iznosi 5 μm . Za svaku stanicu grafički prikaz profila intenziteta signala je ispod slike, a legenda vrijedi za oba prikaza. Način označavanja linije intenziteta signala isti je kao i za sliku 3.14. Strelicom i slovom m označen je intenzitet signala koji odgovara signalu na staničnoj membrani, a slovom p na polovima diobenog vretena.

3.6.2. Kontrola optogenetičkog sustava za protein NuMA

Za kontrolu optogenetičkog sustava korištene su stanice koje su imale ekspresiju s oba potrebna plazmida i postavke snimanja poput onih za ispitivanje sustava, osim što nije bilo paljenja plavog lasera, zbog čega ne bi trebalo doći do njegove aktivacije. Na slici 3.17. prikazane su slike stanica u nultoj, prvoj, petoj i desetoj minuti snimanja za četiri stanice, a na slici 3.18. su pripadajući grafički prikazi profila intenziteta signala za protein NuMA-RFP-SspB. Na slikama i grafičkim prikazima se može primijetiti da bez paljenja plavog lasera nema dolaska fuzijskog proteina na membranu, a intenzitet signala u cijeloj stanici vremenom opada.



Slika 3.16. Kontrola optogenetičkog sustava za protein NuMA. Stanice linije HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP transficirane plazmidima optogenetičkog sustava NuMA-RFP-SspB i iLID snimane su deset minuta bez paljenja aktivacijskog lasera i prikazane su snimke četiriju stanica u nultoj, prvoj, petoj i desetoj minuti. Signal za NuMA-RFP-SspB je crvene boje. Mjerilo je 5 μm .



Slika 3.17. Profili intenziteta signala za NuMA-RFP-SspB u kontroli optogenetičkog sustava za protein NuMA. Svaki profil odgovara naznačenoj stanici na slici 3.16. linije HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP u kojima je uspostavljen optogenetički sustav unosom plazmida NuMA-RFP-SspB i iLID. Legenda u donjem desnom kutu vrijedi za sve grafičke prikaze, a način označavanja linije intenziteta signala isti je kao i za sliku 3.14. Maksimumi (eng. *peaks*) predstavljaju intenzitet signala na polovima.

4. Rasprava

4.1. Učinak utišavanja ekspresije proteina LGN na mitotsko diobeno vreteno

Kako bi se istražila uloga proteina NuMA u mitotskim stanicama, analizirana je njegova lokalizacija u stanicama HeLa u kojima je utišana ekspresija proteina LGN, budući da se pretpostavlja postojanje njihove interakcije. Analiza rezultata imunofluorescencije proteina LGN u stanicama linije HeLa PRC1-GFP ukazuje na to da je utišavanje ekspresije bilo samo djelomično. Međutim, zbog velike količine signala u citoplazmi čini se da je korišteno primarno antitijelo prilično nespecifično. Promatrajući intenzitet signala za protein LGN nakon provedene imunofluorescencije ne možemo reći da je njegovo utišavanje bilo jako uspješno, ali možemo primijetiti prilično veliku promjenu u fenotipu nakon tretmana specifičnom siRNA, pogotovo nakon 48 sati. Povećan broj multipolarnih vretena i pojava diobenih vretena koja su puno slabije fokusirana, odgovaraju rezultatima iz literature u kojima je zabilježen isti fenotip nakon utišavanja ekspresije proteina LGN (Du i sur. 2001). Jedina dosad dobro opisana funkcija proteina LGN jest pozicioniranje diobnog vretena preko kompleksa LGN na staničnoj membrani koji stvara lokalizirane vučne sile sa staničnog korteksa na astralne mikrotubule (di Pietro i sur. 2016) pa je prema tome ovakav fenotip prilično neočekivan. Također, iz literature je poznato da se isti fenotip javlja i prilikom povećanja ekspresije proteina LGN (Du i sur. 2002). Napravljeni su brojni eksperimenti čiji su rezultati potvrdili postojanje direktne interakcije između proteina LGN i proteina NuMA te je utvrđeno da je mjesto njihove interakcije u blizini domene kojom se NuMA veže za mikrotubule i stabilizira ih. Smatra se da LGN tom interakcijom negativno regulira vezanje proteina NuMA na mikrotubule, što bi moglo biti važno prilikom sastavljanja diobnog vretena jer su (-) krajevi mikrotubula iznimno dinamični i gube podjedinice zbog toka prema polu (eng. *poleward flux*). Pokusi koji su napravljeni da bi dokazali ovu teoriju bili su testovi *in vitro* na staničnim ekstraktima jaja žabe (Du i sur. 2002), no nedostaju snažniji dokazi dobiveni eksperimentima u stanicama sisavaca. Osim toga, ovom teorijom je teško objasniti kako dolazi do pojave i multipolarnih i defokusiranih vretena prilikom pojačane ekspresije i prilikom utišavanja ekspresije proteina LGN.

Kao jedan od pokazatelja utjecaja utišavanja ekspresije proteina LGN na diobeno vreteno osim stvaranja manje fokusiranih vretena, Du i suradnici (2001) su naveli promjenu lokalizacije proteina NuMA. U ovome radu nije zabilježena promjena u lokalizaciji proteina NuMA već samo povećanje ukupne količine signala na vretenu prilikom utišavanja ekspresije proteina LGN. Povećanje ukupne količine signala nakon 24 sata je bilo statistički značajno u odnosu na kontrolu, dok nakon 48 sati nije. Također uočljiv je pad količine signala u stanicama tretiranim tijekom 48 sati, što je najvjerojatnije posljedica toga što su one snimane jedan dan kasnije nego stanice tretirane 24 sata. Zbog duljeg stajanja, vrlo je vjerojatno da se intenzitet signala sekundarnih antitijela smanjio prilikom njihovog pobuđivanja. Kako je ukupna količina signala (integrirana gustoća) zapravo umnožak površine (u ovom slučaju diobenog vretena) i srednje vrijednosti intenziteta signala, zanimljivo je bilo uočiti da su se u stanicama tretiranim specifičnom siRNA tijekom 24 sata blago povećale i površina vretena i srednja vrijednost intenziteta u odnosu na kontrolu, ali ta razlika nije statistički značajna, dok razlika u ukupnoj količini signala jest. Povećanje količine signala proteina NuMA na vretenu moglo bi se objasniti time što utišavanjem ekspresije proteina LGN NuMA ne može stvoriti kompleks na staničnoj membrani pa ostaje na vretenu. Ipak, ovakva pretpostavka bi se morala dodatno potvrditi jer, iako se NuMA u ovom slučaju ne može vezati na membranu preko kompleksa LGN, moguće je da se otpušta s vretena u citoplazmu. Pokazano je da fosforilacija i defosforilacija tijekom različitih faza mitoze određuju promjenu lokalizacije proteina NuMA tj, njezino vezanje na polove i otpuštanje s polova (Radulescu i Cleveland, 2010). Du i suradnici (2001) su također pokazali da se prilikom utišavanja ekspresije proteina LGN kromosomi ne mogu poravnati u metafaznoj ploči što nije zabilježeno u ovome radu. Razlike u rezultatima mogu biti uzrokovane time što su eksperimenti rađeni na različitim staničnim linijama (pokusi Du i suradnika rađeni su na staničnoj liniji MCDK) te zbog razlike u tipu siRNA i duljini tretmana (kod Du i suradnika tretman je trajao 70 sati).

Osim promjene u arhitekturi diobenog vretena prilikom utišavanja ekspresije proteina LGN u obliku manje fokusiranih vlakana mikrotubula koji strše izvan vretena, zabilježena je i promjena u duljini diobenog vretena nakon utišavanja, koja nije statistički značajna uspoređujući s kontrolom u istom trajanju tretmana. Ipak, promatramo li duljine vretena u stanicama tretiranim specifičnom siRNA tijekom 48 sati vidimo da se statistički značajno povećavaju u odnosu na vretena u stanicama tretiranim 24 sata, bilo kontrolnom bilo specifičnom siRNA. U literaturi nije pronađen utjecaj utišavanja ekspresije proteina LGN na duljinu diobenog vretena. Ono što je poznato je da na duljinu vretena, između ostalog, djeluju

i sile povlačenja astralnih mikrotubula koje bi ga trebale rastezati i tako malo povećati njegovu duljinu (Goshima i Scholey, 2010). Prema tome bi smanjenjem količine proteina LGN u stanicama očekivali skraćivanje diobenog vretena zbog smanjene mogućnosti stvaranja vučnih sila s LGN kompleksa na membrani na astralne mikrotubule. Osim toga, pokazano je da inhibicija vezanja proteina NuMA na mikrotubule dovodi do produljenja diobenog vretena. Pretpostavlja se da do produljenja dolazi zbog toga što NuMA zajedno s kompleksom dineina i dinaktina pozicionira kinezin Kif2a na polove gdje on depolimerizira mikrotubule. Osim toga, moguće je da NuMA međusobnim interakcijama te interakcijama s mikrotubulima i drugim proteinima stvara mehaničko ograničenje koje sprječava razdvajanje polova (Gaetz i Kapoor, 2004). Kako je pokazano da LGN može djelovati kao inhibitor vezanja proteina NuMA za mikrotubule, očekivali bismo da će utišavanjem njegove ekspresije doći do skraćivanja diobenog vretena. Dakle, prema dosadašnjim saznanjima teško je objasniti zašto bi došlo do produljenja diobenog vretena utišavanjem ekspresije proteina LGN. Također, mora se naglasiti da je to produljenje vrlo malo, no u svakom slučaju ne dolazi do skraćivanja diobenog vretena što bi se prema literaturi očekivalo.

Kiralnost diobenog vretena je njegovo novootkriveno svojstvo koje se očituje u činjenici da vlakna mikrotubula u diobnom vretenu stvaraju blagu lijevu uzvojniciu čiji je prosječni helicitet $-2^\circ/\mu\text{m}$ (Novak i sur. 2017). Prema dosadašnjim pretpostavkama mogući uzrok heliciteta je okretni moment koji se stvara u samome vretenu najvjerojatnije zbog kretanja motornih proteina koji se po mikrotubulima ne kreću ravno već zakreću na svojem putu (Yajima i sur. 2008, Walker i sur. 1990, Bormuth i sur. 2012, Can i sur. 2014). Pokazano je da inhibicijom motorne aktivnosti proteina Eg5 (koji također zakreće pri kretanju) dolazi do značajnog smanjenja heliciteta vlakana mikrotubula u stanicama (Novak i sur. 2017). Dakle, na helicitet u diobnom vretenu ne bi trebale utjecati sile koje preko astralnih mikrotubula djeluju na vreteno. To je pokazano tretmanom stanica latrunkulinom - tvari koja depolimerizira aktinski korteks čime se poremetilo stvaranje vučnih sila na astralne mikrotubule. Nakon tretmana nije došlo do statistički značajne promjene u helicitetu vlakana mikrotubula (Novak i sur. 2017). Prema ovome, utišavanje ekspresije proteina LGN također ne bi trebalo promijeniti helicitet vlakana mikrotubula. Međutim, helicitet se značajno smanjio u živim stanicama tretiranim specifičnom siRNA u odnosu na kontrolne stanice tijekom 24 sata. Obzirom da utišavanje ekspresije proteina LGN uzrokuje promjene u veličini i arhitekturi diobenog vretena, vjerojatno uklanjanje sila koje djeluju na astralne mikrotubule nije jedini učinak utišavanja.

Zbog toga je moguće da do ovako neočekivanog rezultata dolazi zbog dodatne funkcije proteina LGN koja još nije opisana.

Sljedeći korak bio je utvrditi lokalizaciju motornog proteina Eg5 nakon utišavanja ekspresije proteina LGN. Osim što je pokazano da Eg5 utječe na stvaranje heliciteta vlakana mikrotubula u diobenom vretenu (Novak i sur. 2017), utvrđeno je i da sudjeluje u lokalizaciji proteina NuMA na polovima diobenog vretena (Iwakiri i sur. 2013). Lokalizacija proteina Eg5 je u svim ispitivanim stanicama bila normalna, tj. signal je prisutan duž mikrotubula, a pojačava se prema polovima. Zanimljivo je da je tretman specifičnom siRNA tijekom 48 sati uzrokovao statistički značajno povećanje količine signala za protein Eg5 u odnosu na kontrolu te na tretman tijekom 24 sata. Osim ukupne količine signala, statistički je značajno povećana i srednja vrijednost intenziteta signala, za razliku od signala za protein NuMA. Taj rezultat je također neobičan obzirom na to da inhibicija proteina Eg5 uzrokuje smanjenje heliciteta vlakana mikrotubula, a utišavanjem ekspresije proteina LGN se količina proteina Eg5 na vretenu povećava. Ipak, količina signala za protein Eg5 nije značajno porasla u tretmanu specifičnom siRNA tijekom 24 sata u odnosu na kontrolu, a helicitet je mjereno samo na stanicama tretiranim tijekom 24 sata. Osim toga, veća količina proteina Eg5 ne mora nužno značiti i da je njegova ukupna motorna aktivnost na vretenu pojačana.

Uzmemo li u obzir sve dobivene rezultate nakon utišavanja ekspresije proteina LGN, možemo zaključiti da vrlo vjerojatno protein LGN direktno ili indirektno utječe na sastavljanje i na arhitekturu diobenog vretena, i to ne samo silama koje na vreteno djeluju preko astralnih mikrotubula. Također, čini se da u stanicama linije HeLa utjecaj na diobeno vreteno nije samo zbog vezanja proteina LGN na protein NuMA čime se inhibira njegovo vezanje na mikrotubule. Svakako su potrebna dodatna istraživanja da bi se utvrdilo na koji način LGN djeluje na sastavljanje i arhitekturu diobenog vretena. Bilo bi korisno detaljnije ispitati s kojim proteinima LGN stvara interakcije u stanicama i pomoću antitijela veće specifičnosti pokušati bolje odrediti njegovu lokalizaciju u stanicama u mitozu. Također, bilo bi korisno napravljene eksperimente ponoviti na netumorskim staničnim linijama zbog toga što tumorske stanice imaju promijenjene brojne stanične procese i vrlo su heterogene unutar iste linije (Pecorino, 2012). Također, mitozu je jako robustan proces i promjene u određenim regulatornim faktorima u tumorskim stanicama mogu nadvladati problem promjene ekspresije ili aktivnosti nekog proteina (Waitzman i Rice, 2014).

4.2. Djelovanje inhibitora motorne aktivnosti proteina Eg5 na lokalizaciju proteina NuMA

Kako bi se utvrdio utjecaj motorne aktivnosti proteina Eg5 na protein NuMA u diobenom vretenu analizirana je lokalizacija proteina NuMA imunofluorescencijom nakon djelovanja inhibitora STLC i FCPT. Oba inhibitora su visoko specifična za inhibiciju motorne aktivnosti proteina Eg5 (Kozielski 2015, Groen i sur. 2008). STLC inhibira motornu aktivnost proteina Eg5 tako da alosteričkim mehanizmom smanjuje njegov afinitet za mikrotubule i inhibira njegovu ATP-aznu aktivnost (Waitzman i Rice, 2014). S druge strane, FCPT djeluje kao kompetitivni inhibitor za ATP i čvrsto veže Eg5 za mikrotubule u diobenom vretenu (Groen i sur. 2008). Pokazano je da Eg5 i NuMA imaju direktne interakcije te da je prisutnost Eg5, ali ne i njegova motorna aktivnost potrebna za lokalizaciju proteina NuMA (Iwakiri i sur. 2013). Prema tome, očekivano je da inhibitori motorne aktivnosti Eg5 neće utjecati na lokalizaciju proteina NuMA i prema očekivanjima uočena je lokalizacija proteina NuMA na polovima diobenog vretena. Mjerenjem ukupne količine signala za protein NuMA u stanicama nije uočena statistički značajna razlika među tretmanima sa STLC, FCPT i kontrole. Postoji blago smanjenje u količini signala proteina NuMA prilikom tretmana sa STLC, što odgovara činjenici da STLC smanjuje afinitet proteina Eg5 za mikrotubule. Ipak, uočena je razlika u izgledu signala za protein NuMA. Čini se da iako u tretmanu sa STLC i FCPT NuMA dolazi na polove, ovi inhibitori ipak utječu na morfologiju polova u bipolarnom diobenom vretenu. U oba tretmana polovi izgledaju jače fokusirani i više se ističu unutar vretena. Osim toga češće se uočava signal proteina NuMA na vanjskim mikrotubulima uz polove. Moguće je da postoji utjecaj ovih inhibitora na druge proteine koji su važni u formiranju polova te zbog toga ona izgledaju jače fokusirana. Primjerice, za proteine TPX2 i γ -tubulin je pokazano da se prilikom tretmana s FCPT u vretenima iz ekstrakta jaja žabe uklanjaju s polova i dolaze u ekvatorijalnu ravninu (Groen i sur. 2008). Iako tretman s oba inhibitora uzrokuje pojavu polova koji su jače fokusirani, izgled signala proteina NuMA se međusobno razlikuje. Oba inhibitora su visoko specifična za protein Eg5, ali imaju različiti mehanizam djelovanja. Bilo bi zanimljivo utvrditi zbog čega dolazi do promjene oblika signala za protein NuMA djelovanjem FCPT i STLC te ispitati koja je lokalizacija drugih proteina važnih za formiranje polova u tim tretmanima.

4.3. Optogenetički sustav za protein NuMA

Drugi cilj ovog diplomskog rada bio je razviti optogenetički sustav za protein NuMA. Rezultati aktivacije sustava ukazuju na to da sustav koji je razvijen funkcionira zato što paljenjem aktivacijskog lasera dolazi do translokacije proteina NuMA-RFP-SspB na staničnu membranu, dok u kontrolnom pokusu bez paljenja aktivacijskog lasera ne dolazi do translokacije. Ipak, primijećeno je da jako mali udio ukupnog proteina NuMA-RFP-SspB odlazi na membranu prilikom aktivacije sustava zbog čega se ovaj sustav ne može koristiti za ispitivanje utjecaja uklanjanja većine proteina NuMA s diobenog vretena u metafazi na njegovu arhitekturu. Unatoč tome, sustav bi mogao biti uspješniji na nekoj drugoj staničnoj liniji i bilo bi zanimljivo ispitati njegovu učinkovitost u netumorskim stanicama. Jedan od razloga zašto se NuMA teško uklanja s diobenog vretena u optogenetičkom sustavu je njegoa sporija dinamika izmjene s proteinom NuMA otopljenim u citosolu jer sporija dinamika izmjene može značiti slabiju efikasnost optogenetički uvjetovane translokacije (Milas i sur. 2018). Prosječno vrijeme izmjene citosolnog proteina NuMA i onoga na vretenu iznosi tri minute (Kisurina-Evgenieva i sur. 2004). Uz to postoji frakcija proteina NuMA koja je tijekom mitoze jako čvrsto vezana za diobeno vreteno i praktički ne disocira s njega, a ona iznosi oko 20% ukupnog proteina NuMA u stanici (Kisurina-Evgenieva i sur. 2004). Osim same dinamike proteina NuMA koja sigurno značajno doprinosi slabijoj translokaciji na membranu u optogenetičkom sustavu, moguće je da se u ovom sustavu protein iLID veže za NuMA-RFP-SspB na vretenu. U ovome radu se signal za protein iLID uočava na polovima diobenog vretena što nije njegova normalna lokalizacija (Okumura i sur. 2018). Moguće je da je u stanicama bila iznimno prekomjerna ekspresija proteina iLID te je puno tog proteina ostalo otopljeno u citosolu jer se nije mogao sav vezati na membranu. Tako je moguće da je kada je upaljeno aktivacijsko svjetlo došlo do vezanja otopljenog proteina iLID na NuMA-RFP-SspB na polovima zbog prirodno slabe disocijacije proteina NuMA-RFP-SspB s diobenog vretena i velikog afiniteta njegovog vezanja s proteinom iLID. Na taj način zadovoljen je veliki afinitet vezanja tih dvaju proteina bez potrebe da protein NuMA-RFP-SspB prijeđe s vretena na membranu. Kako nije bilo moguće uspostaviti optogenetički sustav u stanicama koje nisu imale iznimno prekomjernu ekspresiju proteina iLID (u takvim stanicama nije bila vidljiva ekspresija NuMA-RFP-SspB) nije bilo moguće potvrditi ovu teoriju. Još jedna zanimljiva pojava koja je uočena jest porast intenziteta signala proteina NuMA-RFP-SspB na polovima nakon aktivacije sustava čak i nakon što je dio tog proteina prešao na membranu. To je rezultat fotokromatskog ponašanja (eng. *photochromic*

behavior), što je svojstvo crvenog fluorescentnog proteina. Nakon osvjetljavanja plavom ili žutom svjetlošću, intenzitet fluorescencije RFP-a poraste prilikom njegovog naknadnog pobuđivanja (Bindels i sur. 2016).

Idealan optogenetički sustav je reverzibilan, što znači da se prestankom paljenja aktivacijskog svjetla, protein od interesa vrati na početno mjesto gdje se nalazio prije translokacije. Ipak, u ovome radu nije uočen povratak proteina NuMA-RFP-SspB s membrane na polove vretena. Smanjenje intenziteta signala na membrani je vjerojatno više posljedica slabljenja fluorescentnog signala nakon osvjetljavanja nego povratka proteina na polove, jer i 10 minuta nakon gašenja aktivacijskog svjetla još uvijek možemo uočiti signal na membrani, a intenzitet signala na polovima također vremenom opada. Mogući razlog zašto NuMA-RFP-SspB ostaje na membrani unatoč inaktivaciji sustava jest njegovo vezanje na protein LGN na staničnom korteksu i stvaranje prirodno prisutnog LGN-kompleksa (di Pietro i sur. 2016). Na taj način, iako je jako smanjen afinitet vezanja NuMA-RFP-SspB na protein iLID koji je na membrani, fuzijski protein ostaje na membrani zbog velikog afiniteta vezanja proteina NuMA i LGN. Ovu teoriju bi trebalo dodatno potvrditi primjerice utišavanjem ekspresije proteina LGN u stanicama u kojima je aktiviran optogenetički sustav.

Dakle, optogenetički sustav za protein NuMA razvijen u ovom diplomskom radu funkcionira, međutim zbog nedovoljne efikasnosti uklanjanja proteina NuMA s diobenog vretena i izostanka reverzibilnosti tog procesa ograničena je njegova primjena za daljnje eksperimente. Potrebno je dodatno isprobati osjetljivost sustava na drugim stanicama, pogotovo na netumorskim staničnim linijama i u drugim fazama mitoze. Ukoliko bi se u tim stanicama aktivacijom sustava većina fuzijskog proteina NuMA-RFP-SspB mogla translocirati s polova vretena na membranu u stanicama u kojima je prethodno utišana ekspresija endogenog proteina NuMA, takav sustav bi bio moćan alat u istraživanju funkcije proteina NuMA u diobenom vretenu. To bi omogućilo direktno promatranje funkcije proteina u određenoj fazi mitoze pri čemu je vreteno prvotno sastavljeno uz prisutnost proteina NuMA, za razliku od pokusa u kojima se ekspresija proteina dugoročno utišava.

5. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da protein LGN najvjerojatnije ima dodatnu funkciju tijekom mitoze koja još nije opisana, a djeluje direktno na samom diobenom vretenu ili indirektno utjecajem na druge proteine diobenog vretena. Utišavanjem njegove ekspresije dolazi do stvaranja slabije fokusiranih i multipolarnih vretena, blagog produljenja vretena, smanjenja njegove kiralnosti te blagog povećanja ukupne količine proteina NuMA i Eg5 na vretenu. Za ove promjene u stanici nakon utišavanja ekspresije proteina LGN se ne može izričito tvrditi da su posljedica gubitka LGN kompleksa, a stvaranje tog kompleksa i njegovo generiranje vučnih sila koje djeluju na astralne mikrotubule jedina je do sada dobro opisana funkcija proteina LGN. Također, ovakav fenotip se ne može objasniti ni teorijom iz literature da LGN djeluje isključivo kao inhibitor vezanja proteina NuMA na mikrotubule u vretenu.

Protein NuMA nalazi se na polovima diobenog vretena i nakon inhibicije motorne aktivnosti proteina Eg5 koji sudjeluje u njegovoj lokalizaciji. Ipak dolazi do promjene morfologije polova djelovanjem inhibitora STLC-a i FCPT-a pri čemu polovi djeluju jače fokusirani. Prilikom svih napravljenih perturbacija u stanici, lokalizacija proteina NuMA je ostala očuvana kao i polovi diobenog vretena.

U ovome radu razvijen je i optogenetički sustav za protein NuMA koji se pokazao funkcionalnim zbog toga što se protein NuMA fuzioniran s RFP-om i SspB-om uspio translocirati na staničnu membranu aktivacijom sustava plavom svjetlošću. Ipak, ovaj optogenetički sustav u staničnoj liniji HeLa sa stabilnom ekspresijom fuzijskog proteina PRC1-GFP nije dovoljno efikasan da bi se mogla detaljnije utvrditi uloga proteina NuMA u sastavljanju i arhitekturi diobenog vretena, jer nije očito uklanjanje proteina s polova vretena. Ukoliko bi se postigla bolja efikasnost sustava u drugoj staničnoj liniji on bi mogao biti iznimno moćan alat za precizno određivanje funkcije proteina NuMA u diobenom vretenu tijekom mitoze, promatranjem promjena u diobenom vretenu prilikom njegovog trenutnog uklanjanja s polova.

6. Literatura

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.

Bindels D. S., Haarbosch L., van Weeren L., Postma M., Wiese K. E., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., Hink M. A. (2016): mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat Methods* **14**: 53-56.

Bormuth V., Nitzsche, B., Ruhnnow F., Mitra A., Storch M., Rammner B., Howard J., Diez S. (2012): The highly processive kinesin-8, Kip3, switches microtubule protofilaments with a bias toward the left. *Biophys J* **103**: L4-6.

Can S., Dewitt M. A., Yildiz A. (2014): Bidirectional helical motility of cytoplasmic dynein around microtubules. *Elife* **3**: e03205.

Carminati M., Gallini S., Pirovano L., Alfieri A., Bisi S., Mapelli M. (2016): Concomitant binding of Afadin to LGN and F-actin directs planar spindle orientation. *Nat Struct Mol Biol* **23**: 155-163.

Cheeseman I. M., Desai, A. (2008): Molecular architecture of the kinetochore microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 33-46.

Deisseroth K. (2011): Optogenetics. *Nature Methods* **8**: 26-29.

di Pietro F., Echard A., Morin X. (2016): Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view. *EMBO Rep* **17**: 1106-1130.

Du Q., Stukenberg, P. T., Macara, I.G. (2001): A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat Cell Biol* **3**: 1069–1075.

Du Q., Taylor L, Compton D. A., Macara I. G. (2002): LGN blocks the ability of NuMA to bind and stabilize microtubules. A mechanism for mitotic spindle assembly regulation. *Curr Biol* **12**: 1928-1933.

Fant X., Merdes A., Haren L. (2004): Cell and molecular biology of spindle poles and NuMA. *Int Rev Cytol* **238**: 1-57.

Gaetz J., Kapoor T. M. (2004): Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J Cell Biol* **166**: 465-71.

Gönczy P. (2008): Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nature Rev Mol Cell Biol* **9**: 355-366.

Goshima G., Scholey J. M. (2010): Control of mitotic spindle length *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 21-57.

Groen A. C., Needleman D., Brangwynne C., Gradinaru C., Fowler B., Mazitschek R. (2008): A novel small-molecule inhibitor reveals a possible role of kinesin-5 in anastral spindle-pole assembly. *J Cell Sci* **121**: 2293-2300.

Guntas G., Hallett R. A., Zimmerman S. P., Williams T., Yumerefendi H., Bear J. E. (2015): Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 112–117.

Hueschen C. L., Kenny S. J., Xu K., Dumont S. (2017): NuMA recruits dynein activity to microtubule minus-ends at mitosis. *Elife* **6**: e29328.

Inoue T., Heo W. D., Grimley J. S., Wandless T. J., Meyer T. (2005): An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat Methods* **2**: 415-418.

Iwakiri Y., Kamakura S., Hayase J., Sumimoto H. (2013): Interaction of NuMA protein with the kinesin Eg5: its possible role in bipolar spindle assembly and chromosome alignment. *Biochem J* **451**:195-204

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-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores. *Nat Commun* **7**: 10298.

Kisurina-Evgenieva O., Mack D., Du Q., Macara I., Khodjakov A., Compton D. A. (2004): Multiple mechanisms regulate NuMA dynamics at spindle poles. *J Cell Sci* **117**: 6391-6400.

Kozielski F. (2015): *Kinesins and cancer*. Springer, Dordrecht.

Milas A., Jagrić M., Martinčić J., Tolić I. M. (2018): Optogenetic reversible knocksideways, laser ablation, and photoactivation on the mitotic spindle in human cells. *Methods Cell Biol* ISSN 0091-679X.

Mukherjee A., Repina N. A., Schaffer D. V., Kane R. S. (2017): Optogenetic tools for cell biological applications. *J Thorac Dis* **9(12)**: 4867-4870.

Novak M., Polak B., Simunić J., Boban Z., Kuzmić B., Thomae A.W., Tolić I.M., Pavin N. (2017): The mitotic spindle is chiral due to torques generated by motor proteins. *bioRxiv*, doi: 10.1101/167437.

Okumura M., Natsume T., Kanemaki M. T., Kiyomitsu T. (2018) Optogenetic reconstitution reveals that Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble. *eLife* **7**:e36559.

Pavin N., Tolić I. M. (2016): Self-organization and forces in the mitotic spindle. *Annu Rev Biophys* **45**: 279-298.

Pecorino L. (2012): *Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press, Oxford.

Polak B., Risteski P., Lesjak S., Tolić I. M. (2017): PRC1-labeled microtubule bundles and kinetochore pairs show one-to-one association in metaphase. *EMBO Rep* **18(2)**: 217-230.

Prosser S. L., Pelletier L. (2017): Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**: 187–201.

Pudasaini A., El-Arab K. K., Zoltowski B. Z. (2015): LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling. *Front Mol Biosci* **2**: 18.

Radulescu A. E., Cleveland D. W. (2010): NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends Cell Biol* **20**: 214-222.

Sauer G., Korner R, Hanisch A., Ries A., Nigg E. A., Sillje H. H. W. (2005): Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics* **4**: 35-43.

Silk A. D., Holland A. J., Cleveland D. W. (2009): Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *J Cell Biol* **184**:677-690.

Simunić J., Tolić, I. M. (2016): Mitotic spindle assembly: Building the bridge between sister k-fibers. *Trends Biochem Sci* **41(10)**: 824-833.

Sun Q. Y., Schatten H. (2006): Role of NuMA in vertebrate cells: review of an intriguing multifunctional protein. *Front Biosci* **11**: 1137-1146.

Tolić I. M. (2017): Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. *Eur Biophys J* **47**: 191-203.

Tolić I. M., Pavin N. (2016): Bridging the gap between sister kinetochores. *Cell Cycle* **15(9)**: 1169-1170.

Tucker C. L., Vrana J. D., Kennedy M. J. (2014): Tools for controlling protein interactions using light. *Curr Protoc Cell Biol* **64**: 17.16.1–17.16.20.

Waitzman J. S., Rice S. E. (2014): Mechanism and regulation of kinesin-5, an essential motor for the mitotic spindle. *Biol Cell* **106(1)**: 1-12.

Walker R. A., Salmon E. D., Endow S.A. (1990): The *Drosophila* claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule. *Nature* **347**: 780-782.

Yajima J., Mizutani K. & Nishizaka T. (2008): A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1119-1121.

7. Životopis

Ime i prezime: Stela Jelenić

Datum i mjesto rođenja: 28.04.1994., Rijeka

Obrazovanje:

2016. – 2018. Sveučilišni diplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb
2013. – 2016. Sveučilišni preddiplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb
2009. – 2013. Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka

Međunarodno iskustvo

2017. Volonterska stručna praksa: Laboratorij za molekularnu signalizaciju, Institut za biokemiju II, Sveučilište Goethe, Frankfurt na Majni, Njemačka

Organizacija

2018. SymBioSE 2018 (Europski simpozij studenata biologije) – član organizacijskog odbora
2017. Treći simpozij studenata biologije – tajnica organizacijskog odbora

Popularizacija znanosti

2014. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2014. Noć biologije
2017. Noć biologije
2018. Noć biologije

Nagrade i priznanja

2018. Posebna Rektorova nagrada za sudjelovanje u organizaciji Trećeg simpozija studenata biologije
2017. *Magna cum laude* (preddiplomski studij)
2013. – 2018. Stipendija Grada Rijeke za darovite studente