

Biofizička svojstva proteina regulatora citokineze 1, PRC1, u fazama mitoze ljudskih stanica

Manenica, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:831200>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Martina Manenica

**Biofizička svojstva proteina regulatora
citokineze 1, PRC1, u fazama mitoze ljudskih
stanica**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2020. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biofiziku stanice na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruder Bošković pod mentorstvom prof. dr. sc. Ive Tolić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta European Research Council (ERC) Consolidator Grant, GA 647077.

Zahvale

...dragoj mentorici prof. Tolić. Hvala što ste mi dali priliku i povjerenje da se igram i učim, pokušavam i griješim. Pokazali ste mi kako pristupiti znanstvenom pitanju i naći odgovor, kako riješiti problem, kako razmišljati kao znanstvenica. Vaša energija i strast prema znanosti neizmjerena su motivacija.

...dragoj doc. Dulić. Hvala Vam na svim savjetima, susretljivosti i razumijevanju. Iznimno cijenim Vašu pomoć oko pisanja i realizacije ovog diplomskog rada.

...svima na Kemijskom odsjeku. Bilo je to divno okruženje ovih 5 godina. Nadam se da sam barem malo doprinijela toj našoj zajednici i da će se svaki sljedeći student osjećati ugodno kao ja.

...Tolićima! Najboljoj i najšarenijoj istraživačkoj grupi. Toliko uzajamne podrške kad bi zapelo, ujednačenog prigovaranja kad skroz ne bi išlo, i na kraju smijanja i podizanja kad bi bilo najteže. Od srca hvala Moniki što se od početka FRAPirala sa mnom, što je uvijek tu kad nešto treba i što kao 'osobni šofer' osigurava da se pojavim na vrijeme u labu.

...'Znanstvenim čarolijama'. Hvala toj divnoj ekipi na svemu. Osobito hvala mojoj prethodnici Dajani i nasljednici Jani. Divne ste i posebne! Uvijek sam se mogla osloniti na vas.

...Jozefini, Saši i ekipi 'Trećeg elementa'. Hvala što ste vjerovali u mene i dali mi priliku. Obožavam naš mali tim, vaš entuzijazam i želju da pokažete svima koliko znanost može biti šašava, zabavna i na kraju, bliska svima.

...najboljoj cimerici Snježi što si me trpila 5 godina. Hvala ti za sve one razgovore u sitne sate, podršku uvijek u svemu i buđenja ujutro da ne zakasnim.

...Majki i Ćaći, Kruni, Hrvoju, Mandi, babama, tetki kemičarki, Dori, Saki, Tihi, Petri i malim prijateljicama... Svima 'mojima' zbog kojih sam uvijek 'svoja'. Koliko god daleko odem, vi ste uvijek tu i sve ima više smisla zbog vas.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. Stanična dioba	3
2.1.1. Stanični ciklus	3
2.1.2. Glavne podfaze M faze u eukariotskoj stanici.....	4
2.1.3. Diobeno vreteno.....	6
2.1.4. Uloga K-vlakana i interpolarnih svežnjeva	8
2.1.5. Protein regulator citokineze I.....	10
2.1.6. Model nastanka antiparalelnog preklopa u ovisnosti o PRC1	14
2.2. Proučavanje funkcije i lokalizacije proteina u živom sustavu	15
2.2.1. Stanične linije.....	15
2.2.2. Mikroskopiranje.....	15
2.2.3. Fluorescencija.....	16
2.2.4. Fluorofori.....	17
2.2.5. Zeleni fluorescentni protein (GFP) i njegovi derivati.....	18
2.3. Princip FRAP-a i teorija.....	20
2.3.1. Oporavak fluorescencije nakon fotoizbljeđenja, FRAP	20
2.3.2. Difuzija u otopinama.....	22
2.3.3. Kinetički model	23
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. Materijali i metode.....	26
3.1.1. Uzgoj stanica.....	26
3.1.2. Priprema uzorka za mikroskopiranje	27
3.1.3. Mikroskopiranje	27
3.2. Analiza snimki.....	28
3.2.1. Profil intenziteta i signal PRC1-GFP	28
3.2.2. Analiza FRAP-a	29
3.2.3. Modeliranje FRAP-a.....	29
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Lokalizacija PRC1-GFP u fazama mitoze i karakterizacija svežnja mikrotubula.....	31

4.1.1. Lokalizacija u prometafazi.....	31
4.1.2. Lokalizacija u metafazi	36
4.1.3. Lokalizacija u anafazi i telofazi	37
4.1.4. Intenzitet signala PRC1 u citoplazmi i na vretenu kroz faze.....	39
4.2. Uspostava metode za mjerenje i analizu povratka intenziteta fluorescencije PRC1-GFP..	41
4.2.1. Analiza FRAP krivulje za protein regulator citokineze 1, PRC1, optimirana je na podacima dobivenim u citokinezi.....	41
4.2.2. FRAP PRC1-GFP u citoplazmi.....	44
4.3. Mjerenje i analiza povratka intenziteta fluorescencije PRC1-GFP u svim fazama mitoze nakon fotoizbljeđenja (FRAP PRC1-GFP).....	47
4.3.1. FRAP PRC1-GFP u svežnju u ranoj i kasnoj prometafazi	47
4.3.2. FRAP-PRC1-GFP u magličastoj formi u ranoj prometafazi	52
4.3.3. FRAP PRC1-GFP u svežnju u metafazi	56
4.3.4. FRAP PRC1-GFP u svežnju u anafazi.....	61
4.3.5. FRAP PRC1-GFP u svežnju u telofazi/citokinezi	66
4.3.6. Usporedba biofizikalnih svojstava PRC1-GFP dobivenih na osnovu FRAP eksperimenta unutar različitih faza mitoze	68
4.3.7. Prijedlog za buduća istraživanja	72
§ 5. ZAKLJUČAK	73
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	74
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	75
§ 8. ŽIVOTOPIS	XVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

BIOFIZIČKA SVOJSTVA PROTEINA REGULATORA CITOKINEZE 1, PRC1, U FAZAMA MITOZE LJUDSKIH STANICA

Martina Manenica

Stanična dioba je efikasan je i pouzdan proces koji omogućuje raspodjelu genetičkog i staničnog materijala. Brojni proteini koji omogućuju i reguliraju staničnu diobu vezani su na diobeno vreteno. Jedan od njih je i protein regulator citokineze 1, PRC1. U ovom radu proučavana su biofizička svojstva PRC1 fuzioniranog na zeleni fluorescentni protein, GFP, metodom oporavka fluorescencije nakon fotoizbljeđenja (FRAP) u ljudskim stanicama. Od početka do kraja diobe afinitet vezanja PRC1-GFP na vreteno se izrazito mijenja. Prilagođavanjem kinetičkog modela na eksperimentalne podatke, pokazano je da je PRC1-GFP na početku diobe mobilan protein koji se prema kraju veže na vreteno sve jačim afinitetom. Na ovaj način dobivene su pouzdane informacije o kinetičkim svojstvima PRC1-GFP u nativnim uvjetima žive stanice.

(77 stranica, 52 slike, 7 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: diobeno vreteno, FRAP, mitoza, PRC1

Mentor: dr. sc. Iva Tolić, zn. savj. i nasl. prof.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
 3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 9.7.2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

BIOPHYSICAL PROPERTIES OF THE PROTEIN REGULATOR OF CYTOKINESIS
1, PRC1, IN THE PHASES OF THE HUMAN CELL MITOSIS
Martina Manenica

Cell division is efficient and precise process which enables the distribution of genetic and cellular material. Numerous proteins that enable and regulate cell division are associated with the microtubule structure called mitotic spindle. One of them is the protein regulator of cytokinesis 1, PRC1. Biophysical properties of PRC1 fused to green fluorescent protein, GFP, were investigated by recovery of fluorescence after photobleaching (FRAP) in human cells. From the beginning to the end of the division, the binding affinity of PRC1-GFP to the spindle changes markedly. By adjusting the kinetical model on the experimental data, it was shown that PRC1-GFP at the beginning of division is a mobile protein loosely bound to the spindle. As the division progresses, binding affinity increases. In this way, reliable information on the kinetic properties of PRC1-GFP was gained in real time in live cells.

(77 pages, 52 figures, 7 tables, 45 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: FRAP, mitotic spindle, mitosis, PRC1

Mentor: Dr. Iva Tolić, Professor

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
2. Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: 9th July 2020

§ 1. UVOD

Za rast i razvoj višestaničnih organizama ključan je proces stanične diobe, u kojem niz biokemijskih i biofizikalnih procesa osigurava pravilnu raspodjelu genetičkog materijala iz jedne stanice u dvije nove stanice kćeri. Riječ je o događaju koji je iznimno kompleksan i strogo reguliran, a značajna metoda za njegovo proučavanje svakako je mikroskopija. Mikroskopija je omogućila uvid u događaje na staničnoj razini na realnoj vremenskoj skali. Osobit napredak donijelo je otkriće fluorescentnih proteina koji se mogu fuzionirati metodama genetičkog inženjerstva na proteine od interesa, te ih se može proučavati fluorescencijskim mikroskopima. Različite metode razvijene su kako bi se dobile što detaljnije informacije o ulozi i lokalizaciji različitih proteina u stanicama i izvanstaničnom prostoru. Mikroskopija je omogućila vizualizaciju više od tisuću proteina koji su ključni za osiguravanje pravilne raspodjele kromosoma u diobi. Većina takvih proteina lokalizira na strukturi građenoj od polimera tubulina, mikrotubula, koja se naziva diobeno vreteno.¹

Jedan od proteina koji osigurava slaganje mikrotubula diobenog vretena u čvrste svežnjeve je protein regulator citokineze 1, PRC1.⁷ Ukoliko se PRC1 fuzionira sa zelenim fluorescencijskim proteinom (engl. *green fluorescent protein*, GFP), dobiva se fuzijski protein PRC1-GFP. On se može vizualizirati u stanicama fluorescencijskim mikroskopom; GFP se pobudi s plavim svjetlom i fluorescentno zračenje se detektira u zelenom dijelu spektra. Ipak, dugotrajnom pobudom ili pobudom visokog intenziteta moguće je uništiti fluorescentni dio GFP-a. Naizgled se čini kao neželjeni efekt, ali dobro osmišljeni eksperiment u kojem se ciljano utišava fluorescencija GFP-a može omogućiti uvid u ponašanje proteina od interesa koji je fuzioniran na GFP. Naime, utišavanjem fluorescencije, ne uništava se protein od interesa, on samo više nije vidljiv na mikroskopu, ali je njegova funkcija u stanici zadržana. Time nastaju dvije frakcije proteina i ukoliko se proučavaju promjene u regiji, moguće je dobiti informacije o dinamičkim svojstvima proteina od interesa bez da se zapravo naruši njegova ekspresija, funkcija ili uspostavljena ravnoteža unutar stanice. Jedan od takvih eksperimenata je i mjerenje oporavka fluorescencije u regiji od interesa nakon fotoizbljeđenja (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP).¹

U ovom radu je primjenom pobudnog zračenja visokog intenziteta utišavana fluorescencija GFP-a fuzioniranog na PRC1 u maloj regiji unutar stanica HeLa sa stabilnom ekspresijom PRC1-GFP. Potom je proučavan povratak fluorescencije, FRAP, unutar iste male regije. Eksperiment je proveden u svim fazama mitoze. Cilj je bio usporediti intenzitet i brzinu povratka fluorescencije između različitih faza, te na takav način dobiti informacije o biofizikalnim svojstvima proteina PRC1 u različitim fazama

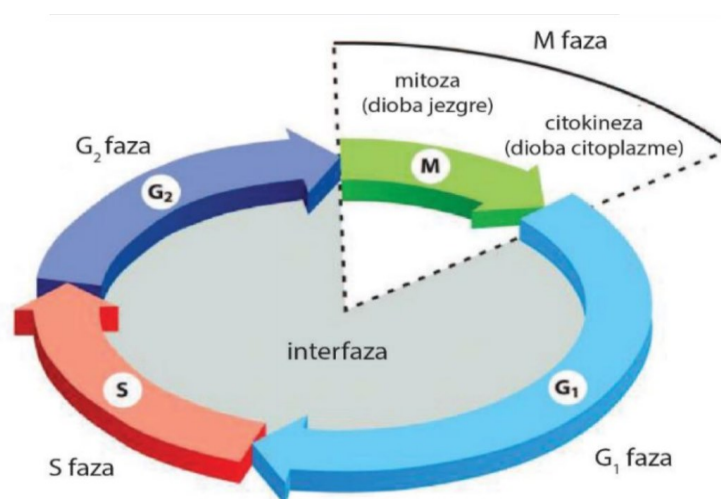
mitoze. U fokusu istraživanja je rana faza mitoze u kojoj se vreteno tek formira i u kojoj PRC1-GFP naizgled pokazuje iznimno dinamično ponašanje, što je ispitano u ovom radu.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Stanična dioba

2.1.1. Stanični ciklus

Stanična dioba biološki je proces kojim se jedna eukariotska stanica dijeli na dvije ili više stanica kćeri. Kod eukariota postoje dvije moguće diobe: mitozu kojom nastaju somatske stanice s jednakim brojem kromosoma kao stanica majka, te mejozu kojom nastaju spolne stanice s polovičnim, haploidnim brojem kromosoma u odnosu na stanicu majku. U oba slučaja dioba završava citokinezom, dijeljenjem citoplazme. Stanična dioba ključni je i završni dio jednog staničnog ciklusa koji se dijeli na četiri faze: G₁, S i G₂ fazu koje zajedno čine interfazu, te M fazu (slika 2.1). U većini stanica postoje dvije G (engl. *gap*) faze koje razdvajaju događaje koji se odvijaju u S i M fazama. G₁ faza je karakterizirana biosintezom proteina i mRNA, te rastom stanice. Glavne promjene karakteristične za interfazu događaju se u S fazi; tada se udvostručuje DNA kako bi obje stanice kćeri dobile istovjetan genetski materijal. U G₂ fazi stanica dodatno raste i prolazi mehanizam provjere replicirane DNA. Na ovaj način se detektiraju i uklanjaju moguća oštećenja DNA prije početka diobe stanice. Nakon G₂ faze, u somatskim stanicama započinje mitozu ili M faza prilikom koje se udvostručeni kromosomi dijele u dvije jezgre novonastalih stanica. Osim podjele jezgre, u M fazi događa se i podjela citoplazme i staničnih organela u procesu koji se naziva citokineza.¹



Slika 2.1. Grafički prikaz staničnog ciklusa. *Gap*-faze, G₁ i G₂, te faza sinteze S čine interfazu. U fazi M događa se mitozu (dioba jezgre) i citokineza (podjela citoplazme i organela). Preuzeto i obrađeno prema ref. 1

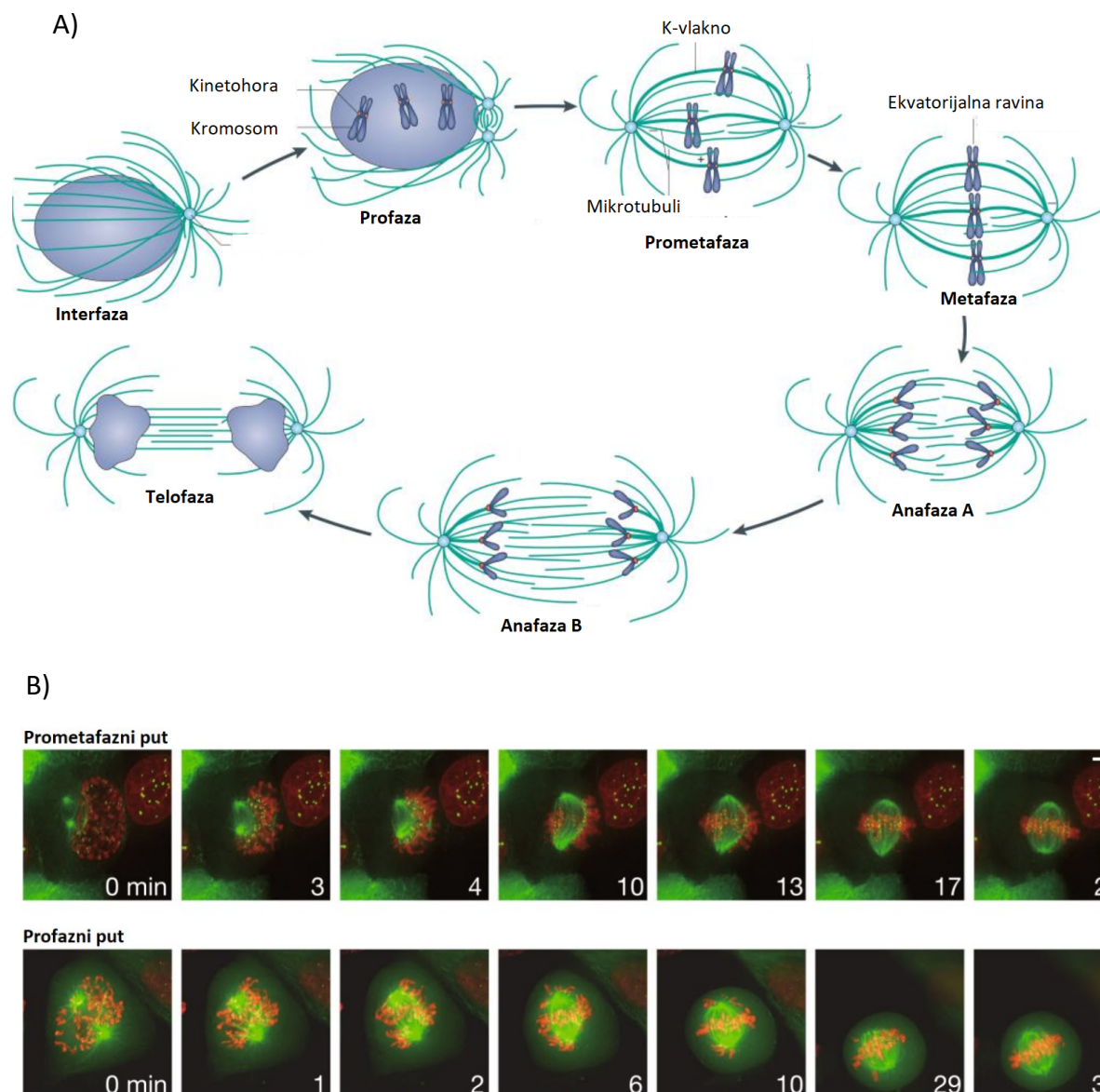
Svi prijelazi iz faze u fazu strogo su kontrolirani djelovanjem kompleksa malih proteina ciklina i ciklin-ovisnih kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase*, Cdk). Ciklini su dobili ime prema opažanju koje je vrijedilo za prve otkrivene, da njihova koncentracija cirkularno varira za vrijeme staničnog ciklusa, a time i aktivnost Cdk. Formiranjem kompleksa ciklina i Cdk aktivno mjesto može djelovati tako što fosforilira ciljne supstrate, nakon što i sam kompleks bude fosforiliran od prethodno aktivnih kinaza. Ovisno o dijelu mitoze u kojima im je najveća koncentracija ciklini su podijeljeni: G1-ciklini, G1/S-ciklini, S-ciklini i M-ciklini¹.

2.1.2. Glavne podfaze M faze u eukariotskoj stanici

Prema fenotipu, M faza podijeljena je na podfaze. Na samom početku diobe, u **profazi**, DNA je već duplicirana i počinje kondenzirati iz kromatin u sestrinske kromatide koje čine kromosom. Centrosomi, koji su također duplicirani u interfazi, odvajaju se jedan od drugog pomoću motornih proteina. Na dva centrosoma nastaju zvjezdasti motivi, građeni od mikrotubula, polimera α - i β -tubulina, iz kojih će se s vremenom razviti diobeno vreteno. Riječ je o strukturi čija je glavna uloga podjela genetičkog materijala u kasnijim fazama. Svaki centrosom građen je od dvaju centriola koja stoje jedan na prema drugom pod pravim kutom i pericentriolarne tvari, a u stanici ima ulogu glavnog organizacijskog središta mikrotubula (engl. *microtubule organizing center*, MTOC) U profazi započinje i raspad jezgrine ovojnice (slika 2.2)¹.

U **prometafazi** koja slijedi, dolazi do raspada jezgrine ovojnice u membranske vezikule. Na centralnom dijelu kromosoma, centromeri, nastaju proteinske strukture-kinetohore koje će omogućiti vezanje mikrotubula. Prometafaza je vrlo aktivan proces u kojem dolazi do vezanja svih kromatida putem kinetohora na suprotne polove vretena, čime nastaje bipolarno vreteno. Mehanizmi kako do toga dolazi nisu detaljno razjašnjeni, no jedan od polaznih modela je 'search-and-capture'². Prema tom modelu mikrotubuli rastu polimerizacijom iz centrosoma u svim smjerovima. Ukoliko pronađu kinetohoru, stabiliziraju se, a ukoliko ne, dolazi do depolimerizacije. Budući da ovaj model ne može objasniti brzinu kojom nastaje vreteno, predloženi su i drugi modeli koji pokazuju da mikrotubuli rastu ciljano prema kinetohorima, kao i da mogu nastajati i na drugim mjestima osim centrosoma poput kinetohora i starih mikrotubula.³ Na mikroskopu je uočeno da se i sama prometafaza može podijeliti prema fenotipu. Nedavno je pokazano da postoje dva moguća slijeda formiranja vretena, ovisno o tome jesu li centrosomi bili s iste ili sa suprotnih strana jezgre. Ukoliko su bili s iste strane, vreteno će se formirati na način da se većina kromosoma veže lateralno na mikrotubule i da nastaje forma koja se naziva rozeta, takav put autori su nazvali prometafazni. Ukoliko su polovi sa suprotnih strana jezgre, i kromosomi će se naći između polova, a metafazna ploča će se formirati profaznim putem (slika 2.2.B).³⁸

Cilj svih složenih procesa je uravnotežiti sile koje djeluju na kinetohore na način da se sestrinske kromatide poslože na sredini vretena, u **metafaznu** ploču. Za pravilnu orijentaciju ključne su sile u vretenu koje kinetohore, pomoću pridruženih proteina, mogu 'osjetiti' i time se centrirati u središte vretena. Ukoliko sile nisu uravnotežene, složena kaskada koja sačinjava mitotsku kontrolnu točku (engl. *spindle assembly checkpoint*, SAC) onemogućava nastavak diobe. Sam proces centriranja izrazito je dinamičan, pri čemu mikrotubuli asociraju i disociraju s kinetohora. Jednom kad su svi kromosomi vezani jednakim brojem mikrotubula i smješteni u središte, utišava se mitotska kontrolna točka, te kreće odvajanje sestrinskih kromatida u procesu **anafaze**. Mikrotubuli se skraćuju i time generiraju sile na kinetohore odvlačeći ih prema polovima u anafazi A, a potom se počinju odvajati i centrosomi u anafazi B, a sve se odvija posredovanjem motornih proteina. Kada se kromatide približe polovima u **telofazi**, dolazi do disocijacije vretena i ponovnog stvaranja nuklearne ovojnice oko svake jezgre te dekonenzacije kromatina. Time završava mitoza. **Citokineza** započinje paralelno s anafazom tako što se stvara kontraktilni prsten od aktinskih i miozinskih filamenata koji će sužavanjem podijeliti citoplazmu kako bi nastale dvije nove stanice kćeri.¹

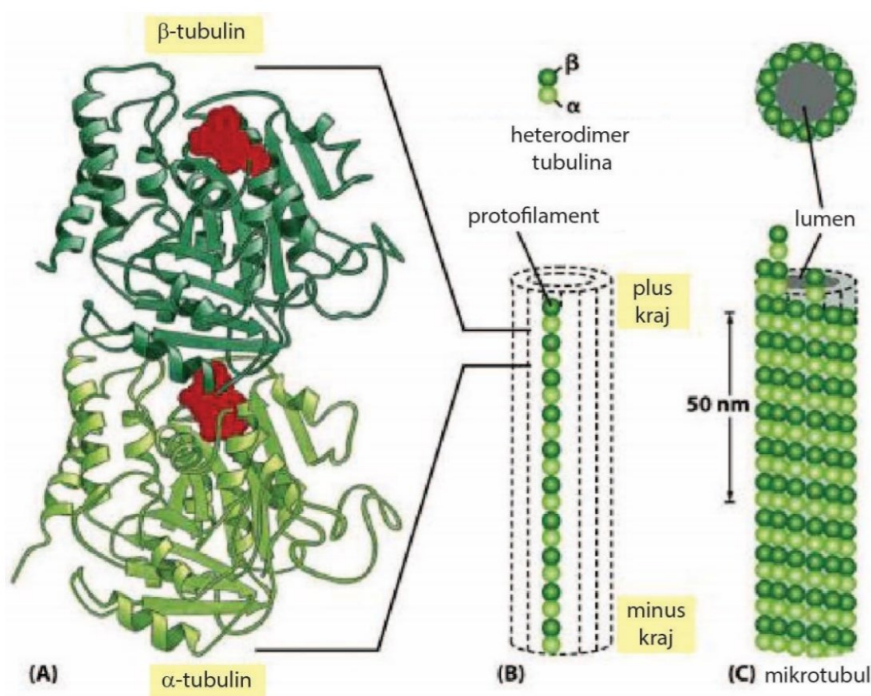


Slika 2.2. Ključni događaji diobe eukariotske stanice. A) Mitoza se dijeli na pet podfaza koje se mogu uočiti pod mikroskopom: profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu. Preuzeto i obrađeno prema ref. 4 B) Prometafazni i profazni put sastavljanja metafazne ploče. Prikazani su kromosomi (crveno) i diobeno vreteno (zeleno). Preuzeto i obrađeno prema ref. 38

2.1.3. Diobeno vreteno

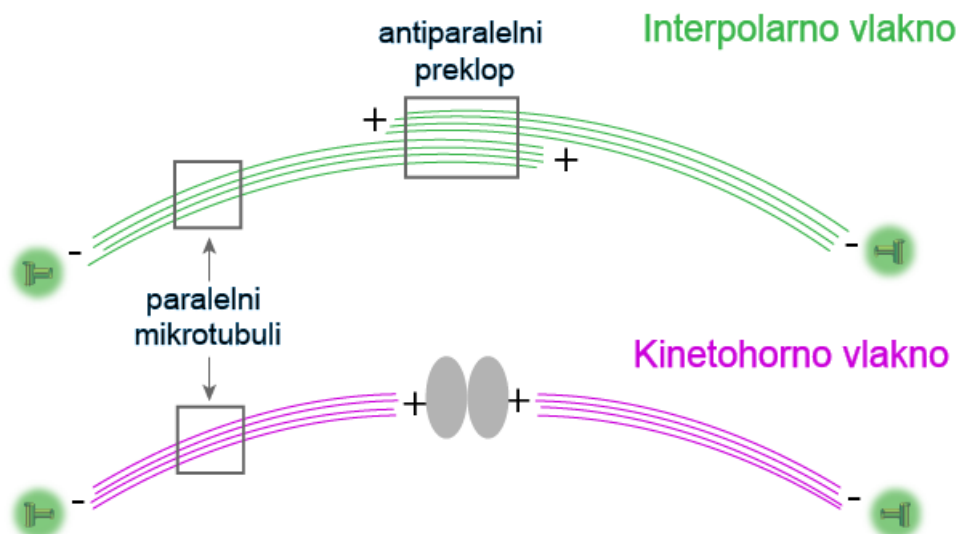
Mikrotubuli, koji grade diobeno vreteno, nastaju polimerizacijom globularnih proteina, α - i β -tubulina, na kompleksu γ -tubulinskog prstena (engl. *γ -tubulin ring complex*, γ -TuRC), kao kalupu za nukleaciju. Svaki mikrotubul građen je najčešće od 13 protofilamenata koji su lateralno povezani, te čine šuplju cilindričnu strukturu. Vanjski promjer mikrotubula je između 23 i 27 nm. Protofilamenti, na jednom kraju imaju β -tubulin koji se naziva (+) kraj, a na drugom kraju α -tubulin nazvan (-) kraj (slika 2.3).^{1,5} Mikrotubuli su dinamične strukture koje se stalno sastavljaju i rastavljaju. To je jasno

vidljivo iz podatka da je životni vijek mikrotubula u diobenom vretenu manji je od 1 minute, dok je u interfazi od 5 do 10 minuta. α - i β -tubulin dijele 50% aminokiselinskog slijeda, a obje jedinice imaju vezno mjesto za GTP. Kada se dimer GTP- α - i GTP- β -tubulina veže na mikrotubul, nakon nekog vremena dolazi do hidrolize GTP-a u GDP u β -tubulinu, dok u α -tubulinu ne dolazi do hidrolize za vrijeme trajanja procesa. Dimer s GDP- β -tubulinom ima manji afinitet za vezanje na polimer i dolazi do depolimerizacije. Ovaj GTP-ciklus je ključan za dinamiku (+) krajeva mikrotubula, koji se ovisno o GTP-u skraćuju ili produžuju.¹



Slika 2.3. Građa mikrotubula. A) Heterodimer koji gradi protofilament građen je od α - i β -tubulina, globularnih proteina koji vežu GTP (crveno). B) Protofilament mikrotubula ima usmjerenje: na minus (-) kraju nalazi se α -tubulin, a na plus (+) kraju β -tubulin. C) Trinaest lateralno vezanih protofilamenata čini mikrotubul. Preuzeto i obrađeno prema ref. 1

U bipolarnom vretenu (-) krajevi mikrotubula nalaze se većinom u polu, vezani na γ -tubulinski prsten, a (+) krajevi idu od pola prema središtu vretena ili prema staničnoj membrani. Mikrotubuli se međusobno vežu u svežnjeve i oni koji potječu s istog pola i time imaju istu polarnost, nazivaju se paralelni. Oni imaju istu orijentaciju, tj. svim mikrotubulima će (-) kraj biti na istom polu, a (+) kraj u središtu vretena. Mikrotubuli koji potječu od suprotnih polova u središtu vretena mogu integrirati pomoću proteinskih poveznica u antiparalelni preklop (slika 2.4).^{1,5,6}



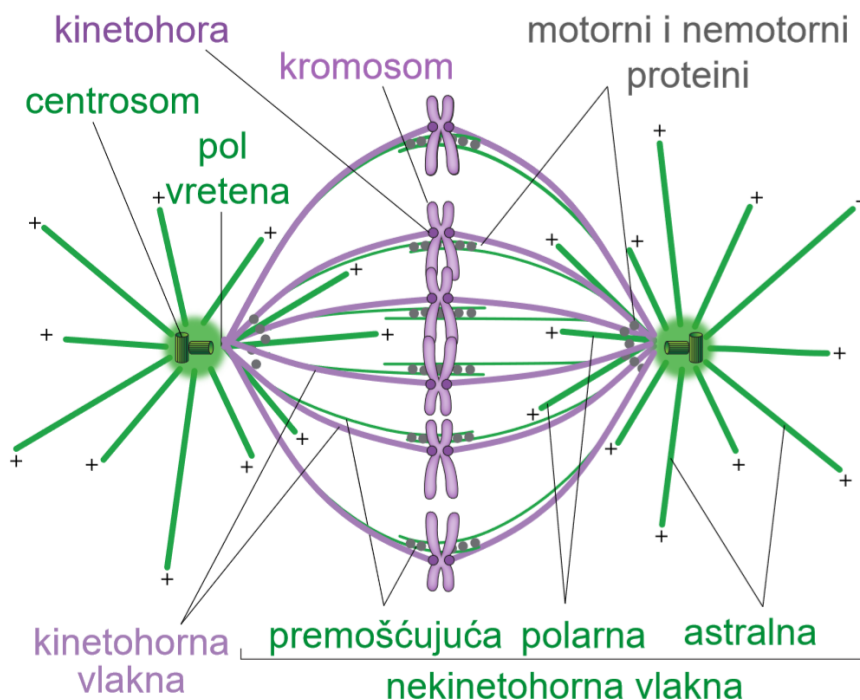
Slika 2.4. Svežnjevi prema usmjerenju. Interpolarna vlakna građena su od mikrotubula koji rastu s različitih polova i imaju suprotno usmjerenje, te se regija preklopa naziva antiparalelnom, tj. antiparalelni preklop. Kinetohorna vlakna građena su od mikrotubula koji rastu s istog pola i imaju isto usmjerenje, stoga je riječ o paralelnim svežnjevima. Polovi su prikazani zelenom, a kinetohore sivom bojom. Priredeno prema ref. 1,5-7

Jedan od načina da razlikujemo svežnjeve mikrotubula u vretenu ovisno o njihovoj funkciji je na osnovu toga jesu li pričvršćeni na kinetohoru. U slučaju da jesu, nazivaju se kinetohorna vlakna (K-vlakna), u suprotnom su nekinetohorna vlakna. Nekinetohorna vlakna mogu rasti iz polova vretena prema staničnom korteksu i tada se nazivaju polarnim ili astralnim mikrotubulima. Ukoliko rastu od polova prema središtu vretena, nazivaju se interpolarnim mikrotubulima. Kako odmiču faze diobe, dolaze u kontakt s mikrotubulima koji rastu sa suprotnog pola i pritom imaju suprotnu polarost, te čine antiparalelne preklope.⁵⁻⁷

2.1.4. Uloga K-vlakana i interpolarnih svežnjeva

K-vlakna najstabilniji su tip vlakana u vretenu (slika 2.5). To svojstvo pokazano je tzv. hladnim tretmanima (engl. *cold treatment*); stanice se izlože niskoj temperaturi i pritom dolazi do depolimerizacije astralnih i interpolarnih mikrotubula, a K-vlakna ostaju pričvršćena na kinetohore⁸. Za vrijeme metafaze, K-vlakna su izrazito dinamična u blizini kinetohore, skraćuju se depolimerizacijom i ponovno rastu polimerizacijom, pritom pomažući smještanju kromosoma u metafaznu ploču. Za vrijeme anafaze, K-vlakna skraćuju se depolimerizacijom i pritom odvlače sestrinske kromatide na suprotne polove vretena⁷.

Uloga interpolarnih vlakna donekle je poznata u različitim fazama mitoze. U prometafazi je nastanak antiparalelnih preklopa ključan za odvajanje polova u bipolarno vreteno⁹. U anafazi se poveća broj interpolarnih mikrotubula u području između kromatida koje se odvajaju. Antiparalelni preklap se produljuje i time omogućuje odvajanje polova. Također, taj dio, nazvan središnja zona (engl. *midzone*) čini biokemijsku osnovu (engl. *scaffold*) za vezanje proteina koji će uvjetovati uspješnu citokinezu. U tom periodu središnja zona skuplja se u središnje tijelo (engl. *midbody*)¹¹.



Slika 2.5. Prikaz diobenog vretena s označenim osnovnim dijelovima. Diobeno vreteno izgrađeno je od astralnih, kinetohornih i interpolarnih mikrotubula. Interpolarna vlakna mogu se lateralno vezati na kinetohore i tada tvore premošćujuća vlakna. Osnovni dijelovi diobenog vretena su i centrosomi, motorni i nemotorni proteini te kinetohore. Preuzeto i obrađeno prema ref. 7

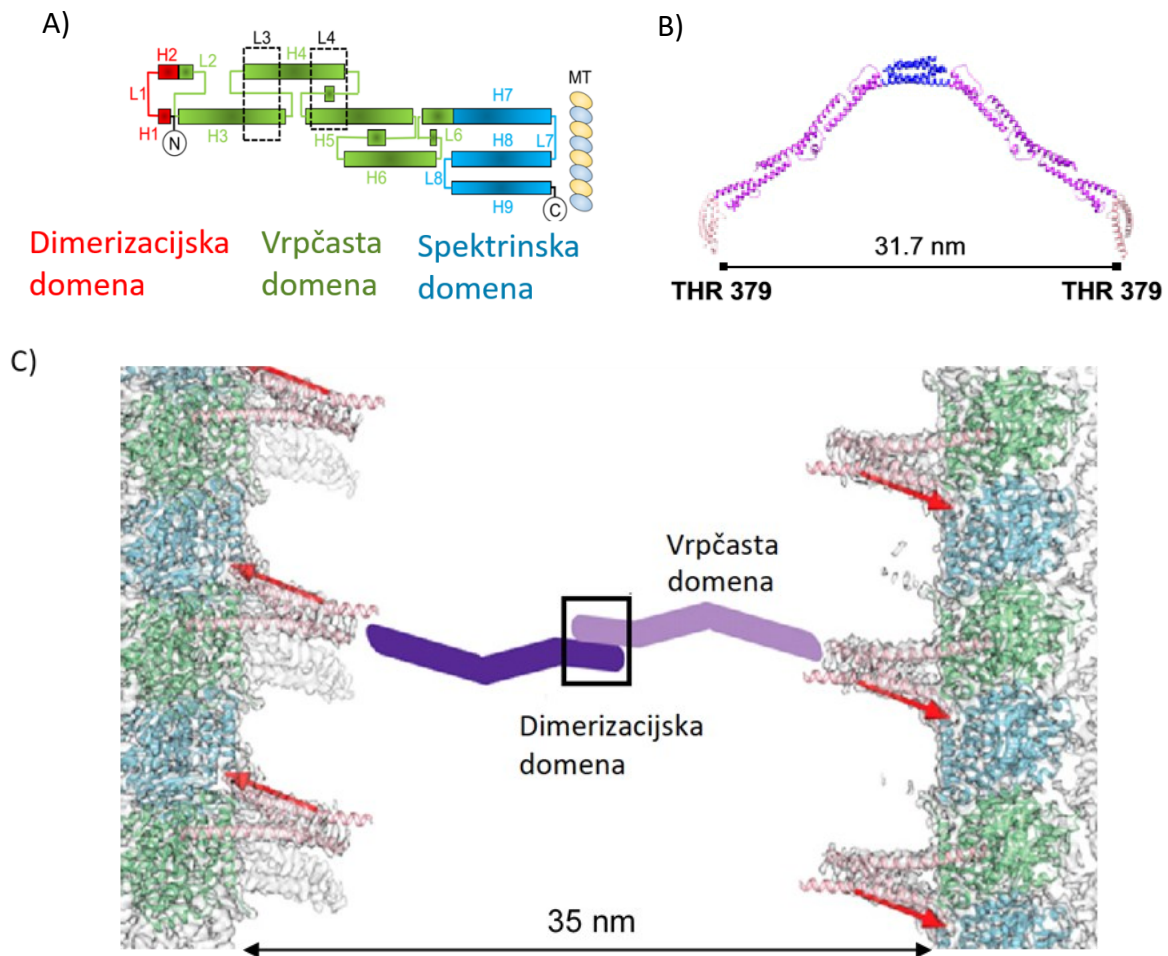
Iako većina slika diobenog vretena u literaturi prikazuje interpolarne svežnjeve i K-vlakna kao neovisne strukture, pokazano je da su oni ipak u interakciji. Naime, uočeni su mikrotubuli čiji je (-) kraj na stijenkama K-vlakana, ali ne završavaju na kinetohori, već se nalaze u prostoru između dvije kinetohore.^{11,12} Taj svežanj mikrotubula između kinetohora čvrsto je vezan na pripadno K-vlakno što je pokazano laserskim mikroablacijama; prilikom rezanja K-vlakna svežanj između kinetohora odmicao se od vretena zajedno s K-vlaknom¹³. Budući da izgleda kao most između dvije kinetohore, to vlakno nazvano je premošćujuće vlakno (engl. *bridging fiber*). Premošćujuće vlakno pomaže uravnotežiti sile u vretenu, te omogućuje da samo vreteno u humanim stanicama ima karakterističan zaobljeni oblik. U slučaju da se premošćujuće vlakno stanji, K-vlakna poprimaju ravniji oblik, što je još jedna potvrda

njihove direktne interakcije, a cijelo vreteno više podsjeća na oblik romba, nego elipse¹⁴. Također, motorni proteini koji se nalaze na premošćujućim vlaknima u anafazi, jedan su od bitnih generatora sila u vretenu koji omogućuju propisno odvajanje kromosoma u stanice kćeri.¹⁵

Upravo motorni i nemotorni proteini koji su u interakciji s mikrotubulima, ključni su za propisno funkcioniranje diobenog vretena. Zajedno se nazivaju proteinima vezanim na vreteno i (engl. *microtubule associated proteins, MAPs*) mogu se podijeliti, ovisno o funkciji i načinu djelovanja, u 4 skupine. Prvu skupinu čine motorni proteini koji pretvaraju kemijsku energiju sadržanu u molekulama ATP-a u mehanički rad te se posljedično usmjereno gibaju po mikrotubulima. Glavni motorni proteini u diobenom vretenu su dinein i kinezini. Drugu skupinu proteina MAP čine proteini koji se nalaze na (+) kraju mikrotubula (engl. *Plus-end tracking proteins, +TIPs*), a treću enzimi koji reguliraju destabilizaciju mikrotubula. Posljednju skupinu proteina MAP čine proteini koji pasivno povezuju i ne kreću se po mikrotubulima (engl. *passive crosslinking proteins*)^{1,7}. Ranije spomenuto premošćujuće vlakno u metafazi je povezano pomoću proteina regulator citokineze 1, PRC1.^{14,16}

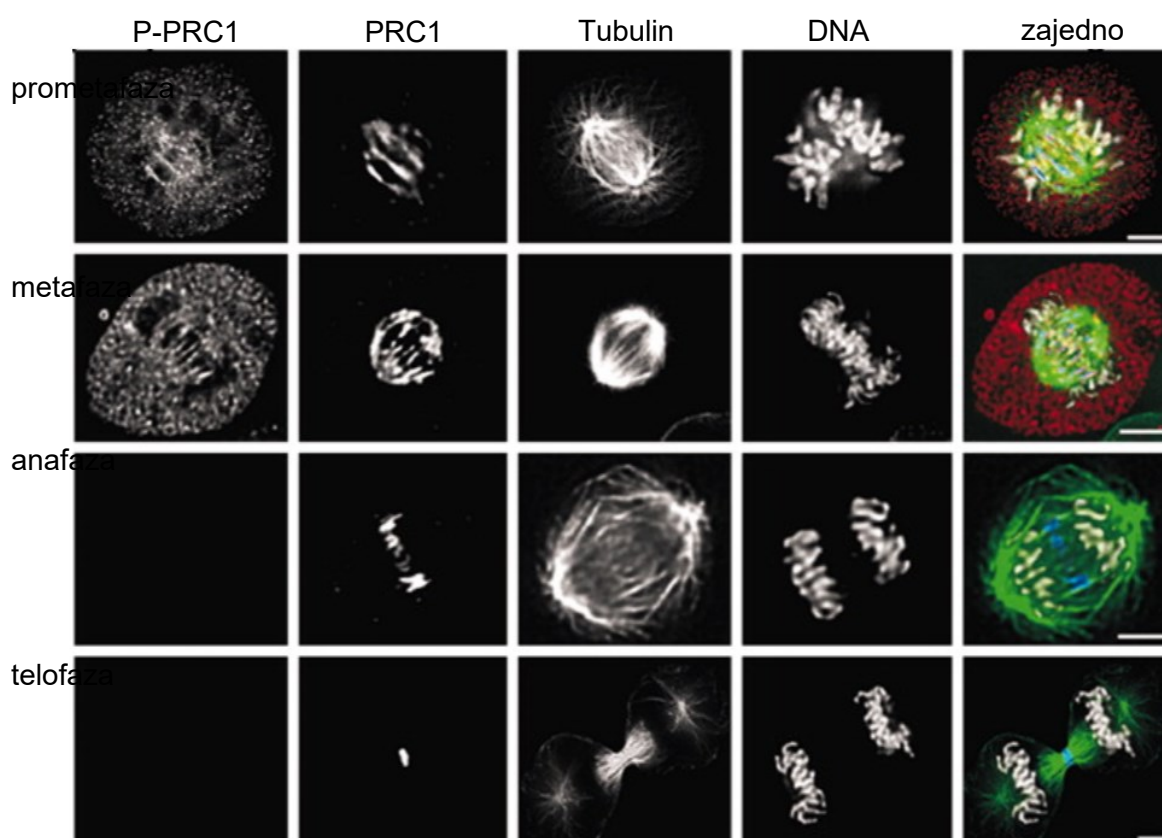
2.1.5. Protein regulator citokineze 1

PRC1 je protein građen od 620 aminokiselina, organiziranih u nekoliko domena: domene za vezanje na mikrotubule, vrpčaste domene, dimerizacijske domene i nestrukturirane domene bogate s Lys i Arg na C-terminalnom kraju. N-terminalni kraj sastoji se od α -zavojnica povezanih petljama, od kojih zadnje dvije čine dimerizacijsku domenu, a središnji dio koji se veže na mikrotubule podsjeća strukturom na proteine vezane na aktin i zato se u literaturi naziva spektrinskom domenom (slika 2.6). Na spektrinsku domenu nastavlja se vrpčasta domena koja omogućuje strukturnu stabilnost i odgovarajuću duljinu kako bi PRC1 obavljao svoju funkciju. Na nju se nastavlja dimerizacijska domena koju čine dvije α -zavojnice povezane petljom u obliku slova U. To im omogućuje fleksibilnost prilikom spajanja s dimerizacijskom domenom drugog monomera PRC1 kako bi se spojili u funkcionalni homodimer. Prilikom dimerizacije, dvije U-domene spajaju se jedna u drugu poput rašlji i time uvjetuju smještanje vrpčastih domena na suprotne strane. Nadalje, to uvjetuje i smještanje spektrinskih domena vezanih na mikrotubule u suprotnom smjeru i antiparalelno usmjeravanje mikrotubula. Dimerizacija je pod kontrolom C-terminalnog kraja na kojem se nalaze fosforilacijska mjesta: Thr-470 i Thr-481.¹⁶⁻²



Slika 2.6. Struktura proteina regulatora citokineze 1. A) Domene PRC1 koje su dobivene kristalografijom. Nestrukturirana domena na C-kraju nije prikazana. Preuzeto i obrađeno prema ref.10 B) Kristalna struktura dimera PRC1. Prikazane su dimerizacijska domena (plavo), vrpčasta domena (tamno ružičasto) i spektrinska domena (svijetlo ružičasto). C) Prikaz povezivanja dva protofilamenta suprotnog usmjerenja. Na dimer α - (zeleno) i β -tubulina (plavo) vezana je spektrinska domena. Preuzeto i obrađeno prema ref. 19

Monomer PRC1, kodiran genom *PRC1*, u interfazi se nalazi u jezgri stanice (slika 2.7). Raspadom jezgrine ovojnice veže se cijelom dužinom vretena. Kao i većina proteina za vrijeme mitoze, njegova funkcija je pod regulacijom ciklin-ovisnih kinaza. Ulaskom u mitozu aktivna je CDK1/ciklin M-ovisna kinaza koja fosforilira PRC1 na mjestima Thr-470 i Thr-481. Osim dimerizacije, onemogućena je i interakcija s ključnim motornim proteinom iz obitelji kinezina KIF4A koji doprinosi preciznoj lokalizaciji PRC1 u središnjoj zoni. Za vrijeme prijelaza iz metafaze u anafazu, utišavanjem SAC-a, dolazi do aktivacije brojnih fosfataza i defosforilacije, i time aktivacije drugih proteina koji će omogućiti odvajanje setrinskih kromatida i polova vretena. Među njima je i PRC1 koji je sada defosforiliran i može dimerizirati.¹⁸

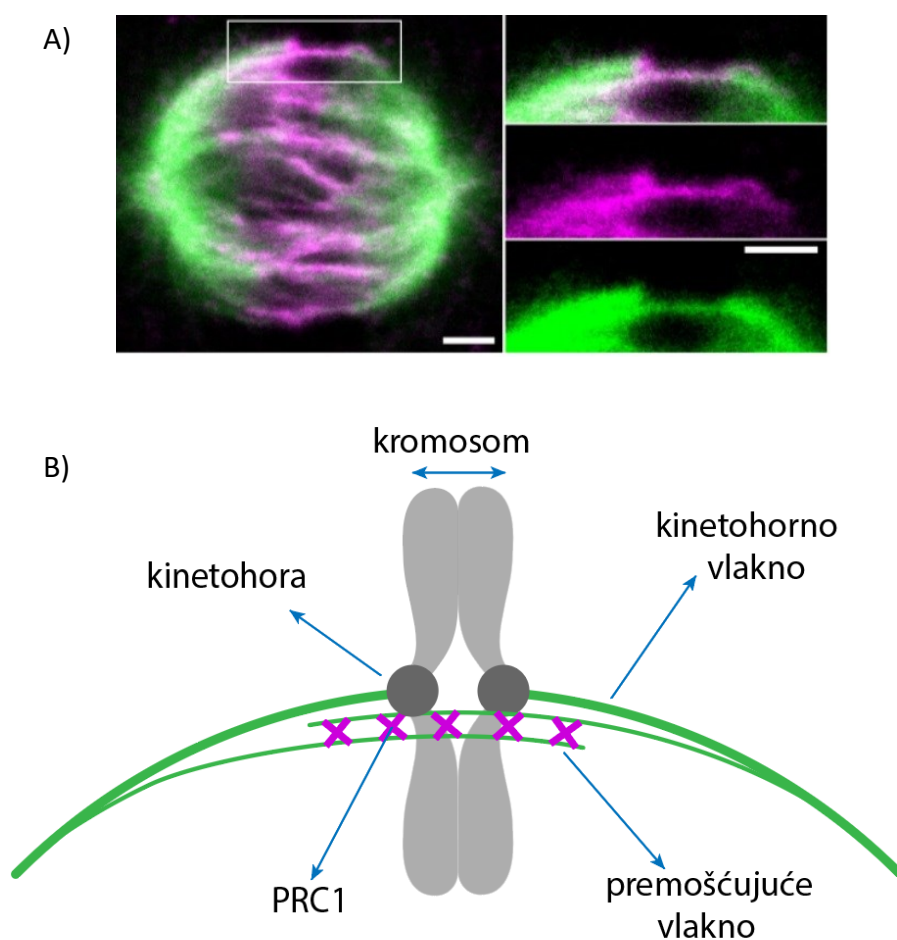


Slika 2.7. Lokalizacija proteina regulatora citokineze 1. P-PRC1 je fosforilirani monomer kojeg ne mogu defosforilirati fosfataze, a PRC1 je funkcionalni protein. Skala je 1 μ m. Preuzeto i obrađeno prema ref. 18

Prema ranijim radovima PRC1 nema mogućnost antiparalelno povezivati mikrotubule u fazama prije anafaze. No pokazano je da se u metafazi nalazi u premošujućim vlaknima¹³, i to na način da gotovo svaki kinetohorni par ima pripadni svežanj povezan s PRC1¹⁶. Ukoliko se PRC1 reverzibilno ukloni s vretena, dolazi do izravnavanja K-vlakna, destabilizacije kinetohornih parova i njihovog raspršenja iz ekvatorijalne ravnine, što se donekle može ispraviti vraćanjem PRC1 u metafazno vreteno¹⁴. Time je

pokazano da ipak postoji određena frakcija PRC1 koja može antiparalelno povezati premošćujuća vlakna (slika 2.8).

Također, pokazano je da su kaskade koje reguliraju PRC1 zapravo složenije i uključuju dodatno fosforiliranje PLK1 kinazom na mjestima Thr-578 i Thr-602 i time aktiviraju dimerizaciju PRC1. Ukoliko su prethodno fosforilirana mjesta Thr-470 i Thr-481, PLK1 se ne može vezati. Njezino vezanje omogućeno je tek ulaskom u anafazu i defosforilacijom tih mjesta. Cilj je spriječiti prerano sastavljanje središnje zone i time odvajanje kromosoma kad još nije postignuto bipolarno vezanje svih kinetohora. Ako se to dogodi, može doći do neravnomjerne raspodjele kromosoma u stanice kćeri, tj. aneuploidije¹⁰.

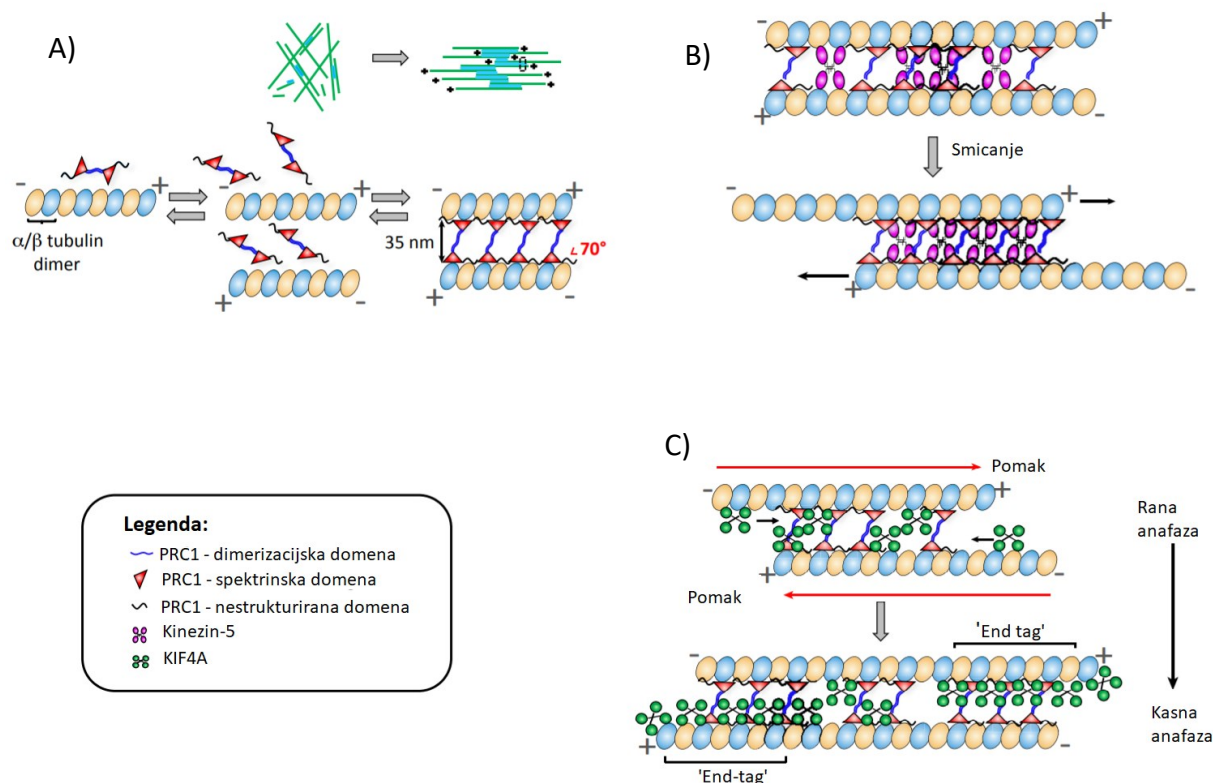


Slika 2.8. Diobeno vreteno i premošćujuća vlakna. A) Vreteno u stanici HeLa. Mikrotubuli su prikazani zelenom (tubulin-GFP), a PRC1 ljubičastom bojom. Premošćujuće vlakno vidljivo je između dva kinetohorna vlakna. Skala je 1 μm . Preuzeto i obrađeno prema ref. 16 B) Shematski prikaz vretena s naznačenim premošćujućim vlaknom i PRC1. Preuzeto i obrađeno prema ref. 21

2.1.6. Model nastanka antiparalelnog preklopa u ovisnosti o PRC1

Prema dostupnim literaturnim podacima, trenutni model nalaže da se PRC1 giba difuzijom po mikrotubulima ~ 7 s prije nego se spektrinskom domenom veže na mikrotubul²⁰. Efikasnost vezanja pojačana je djelovanjem nestrukturirane domene na C-kraju. Drugi, slobodan kraj dimera 'pretražuje' regiju u blizini kako bi antiparalelno vezao dva mikrotubula. Antiparalelni preklop omogućuje motornim proteinima smicanje mikrotubula, na način da se motorne glave pomiču po njemu u suprotnom smjeru i time odmiču mikrotubule. Primjer takvog motornog proteina je kinezin-5 (slika 2.9). Iako je intuitivno da bi PRC1 trebao blokirati smicanje, pokazano je da se mikrotubuli u antiparalelnom preklopu smiču, a da je dužina preklopa obilježena s PRC1 stabilna. Time je ukazano na ulogu PRC1 kao stabilizatora duljine antiparalelnog preklopa.¹⁰ Taj preklop je u metafazi dugačak 4-5 μm ¹⁶, u anafazi A se produljuje, dok u anafazi B zadržava kraći oblik do nastanka središnjeg tijela.^{22,23} Kontrolu duljine antiparalelnog preklopa omogućuje kompleks PRC1-KIF4A.^{10,20}

KIF4A regrutira PRC1 tako što ga usmjerava prema (+) krajevima mikrotubula. U kasnoj anafazi ti kompleksi formiraju 'oznake' (engl. *end-tags*) na (+) krajevima mikrotubula i time sprječavaju daljnje smicanjem te vezanje mikrotubula u središnje tijelo.¹⁰



Slika 2.9. Model nastanka i djelovanja antiparalelnog preklopa. A) Nastanak antiparalelnog preklopa difuzijom PRC1. B) Smicanje unutar preklopa djelovanjem kinezina-5. C) Nastanak 'end-tagova', odnosno krajnjih oznaka koje reguliraju duljinu antiparalelnog preklopa. Preuzeto i obrađeno prema ref. 10

2.2. Proučavanje funkcije i lokalizacije proteina u živom sustavu

2.2.1. Stanične linije

Za istraživanje funkcije proteina u njihovom prirodnom okruženju, u živoj stanici, najčešće se koriste stanične linije koje se mogu uzgajati u kulturi. Prve ljudske stanice koje su mogle živjeti i dijeliti se beskonačno u kulturi stanica su tumorske stanice HeLa. Prednost istraživanja na tumorskim stanicama i razlog zastupljenosti upravo ove linije u brojnim laboratorijima diljem svijeta je njihova vijabilnost i učestala dioba¹. Budući da je riječ o tumorskim stanicama koje se mogu dijeliti i kada nije zadovoljena kontrolna točka, takve stanice s vremenom postaju multipolarne i imaju značajno više kromosoma od netumorskih stanica²⁰, što treba uzeti u obzir prilikom tumačenja rezultata dobivenih u istraživanju.

2.2.2. Mikroskopiranje

Da bi se vizualizirali proteini u njihovom biološkom okruženju, kao i sve druge molekule ključne za život stanice, najčešće se koriste mikroskopi. Mikroskopija je naziv za niz metoda koje omogućuju da se uporabom mikroskopa vide objekti koji nisu vidljivi golim okom. Tri su poznate i ustanovljene grane mikroskopije koje se koriste u brojnim znanstvenim disciplinama: optička (svjetlosna), elektronska i mikroskopija pomoću skenirajuće probe (engl. *scanning probe microscopy*).^{24,25}

U optičkoj mikroskopiji moguće je koristiti fluorescenciju i fosforescenciju kao svojstvo u uzorku kako bi se kasnije dobila slika. Takav mikroskop naziva se fluorescencijskom mikroskopom. Ukoliko ima jednostavniji dizajn kojim se osvjetljava cijeli uzorak pobudnim zračenjem naziva se epifluorescencijski mikroskop. Ukoliko je načinjen da može pomoću rupica kroz koje prolazi ekscitacijska zraka dobiti optičke sekcije i time smanjiti površinu koja je osvjetljena i time postići bolju rezoluciju naziva se konfokalni mikroskop. Osim toga, konfokalni mikroskop, bilo pomakom uzorka ili ekscitacijske zrake omogućuje snimanje slojeva uzorka, a nakon toga posebni softveri mogu složiti slojeve u 3D sliku.^{24,25}

Uzorak se osvjetljava zrakom jedne valne duljine kojoj izvor može biti ksenonska ili živina lampa, a u naprednijim mikroskopima LED sustav ili laser. Točna valna duljina bira se pomoću ekscitacijskog filtera i dolazi do uzorka kroz rupicu. Time se ekscitira samo dio uzorka, koji će onda emitirati svjetlost druge valne duljine. Ta emitirana svjetlost manjeg je intenziteta i potrebno ju je filtrirati od ekscitacijske svjetlosti pomoću interferencijskog zrcala i specifičnog filtera. Nakon toga svjetlost prolazi kroz drugu rupicu koja osigurava da signal dolazi od željenog dijela uzorka. Na taj način dobiva se informacija o točnom signalu, piksel po piksel, te se osim lokalizacije, može dobiti informacija i o količini fluorofora od interesa.^{24,25}

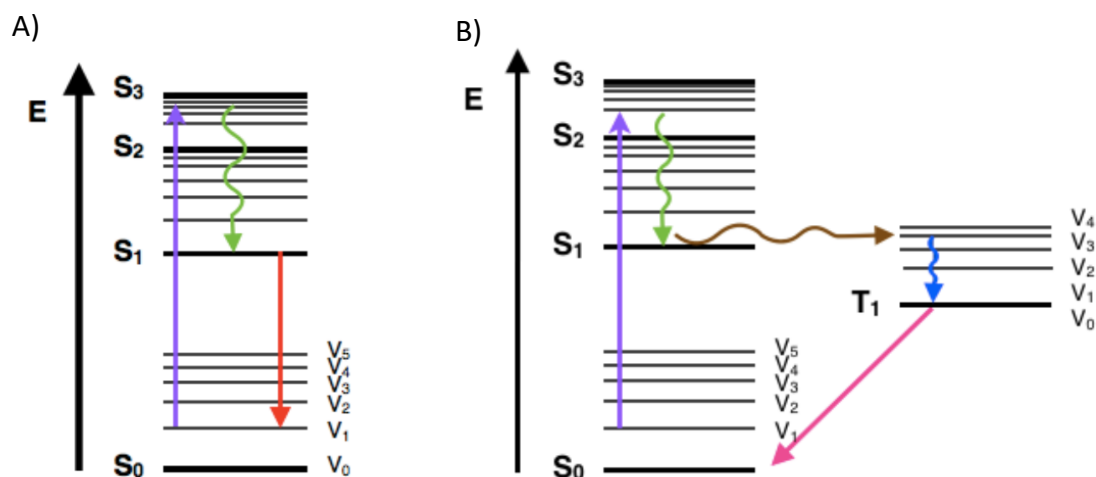
2.2.3. Fluorescencija

Da bi se fluorescencija mogla koristiti u mikroskopiji, potrebno je imati probe koje imaju takva svojstva. Svojstva se najlakše mogu objasniti pomoću dijagrama Jablonskog, pojednostavljenog prikaza elektronskih i vibracijskih stanja molekule i prijelaza iz jednog u drugi. Horizontalne linije predstavljaju spinske multiplicitete, vertikalne ravne strelice radijativne prijelaze, a krivudave strelice neradijativne prijelaze. Svaki elektronski nivo podijeljen je u više vibracijskih nivoa koji su prikazani tanjim horizontalnim linijama.^{24-26,41}

Radijativni prijelazi uključuju apsorpciju fotona koja dovodi do prijelaza u više, pobuđeno stanje, te emisiju fotona koja dovodi do prijelaza u niže stanje. Neradijativni prijelaz se može dogoditi unutar vibracijskih nivoa rasipanjem energije na okolne molekule što se naziva vibracijska relaksacija. Drugi način je interna konverzija koja se dogodi sprežanjem vibracijskog nivoa pobuđenog elektronskog stanja s vibracijskim nivoom nižeg elektronskog stanja. U molekulama koje imaju složeniju elektronsku strukturu mogući su neradijativni prijelazi između vibracijskih nivoa različitih spinskih multipliciteta što se naziva križna relaksacija.²⁴⁻²⁶

Jedan od mogućih scenarija je pobuda molekule fotonom energije $h\nu_1$ koji će dovesti do ekscitacije iz osnovnog singletnog stanja (S_0) u pobuđeno stanje, tj. u viši elektronski i vibracijski nivo (npr. S_2). Molekula ima tendenciju vratiti se u osnovno stanje. U visokim stanjima češće će dolaziti do neradijativnih prijelaza. Jednom kad se molekula nađe u najnižem vibracijskom stanju prvog pobuđenog elektronskog stanja, može doći do radijativnog prijelaza koje uočavamo kao emisiju svjetla energije $h\nu_2$. Budući da je sustav izgubio dio energije na neradijativne prijelaze, emitirano zračenje je manje energije $h\nu_2 < h\nu_1$, a svjetlost koju uočavamo je druge boje, ukoliko ν_1 i ν_2 pripadaju vidljivom dijelu spektra. Upravo na tome se temelji fluorescencijska mikroskopija (slika 2.10.A). Eksitacijska zraka svjetlosti koja dolazi na uzorak ima frekvenciju ν_1 , a uzorak fluorescira frekvencijom ν_2 koju hvata detektor.^{24-26,41}

Ukoliko je došlo ranije do promjene multipliciteta molekule i tzv. zabranjenog prijelaza, moguć je radijativni prijelaz iz tripletnog u osnovno singletno stanje što se naziva fosforescencija (slika 2.10.B). Taj prijelaz puno je rjeđi, i time nalazi rjeđu primjenu.²⁴⁻²⁶

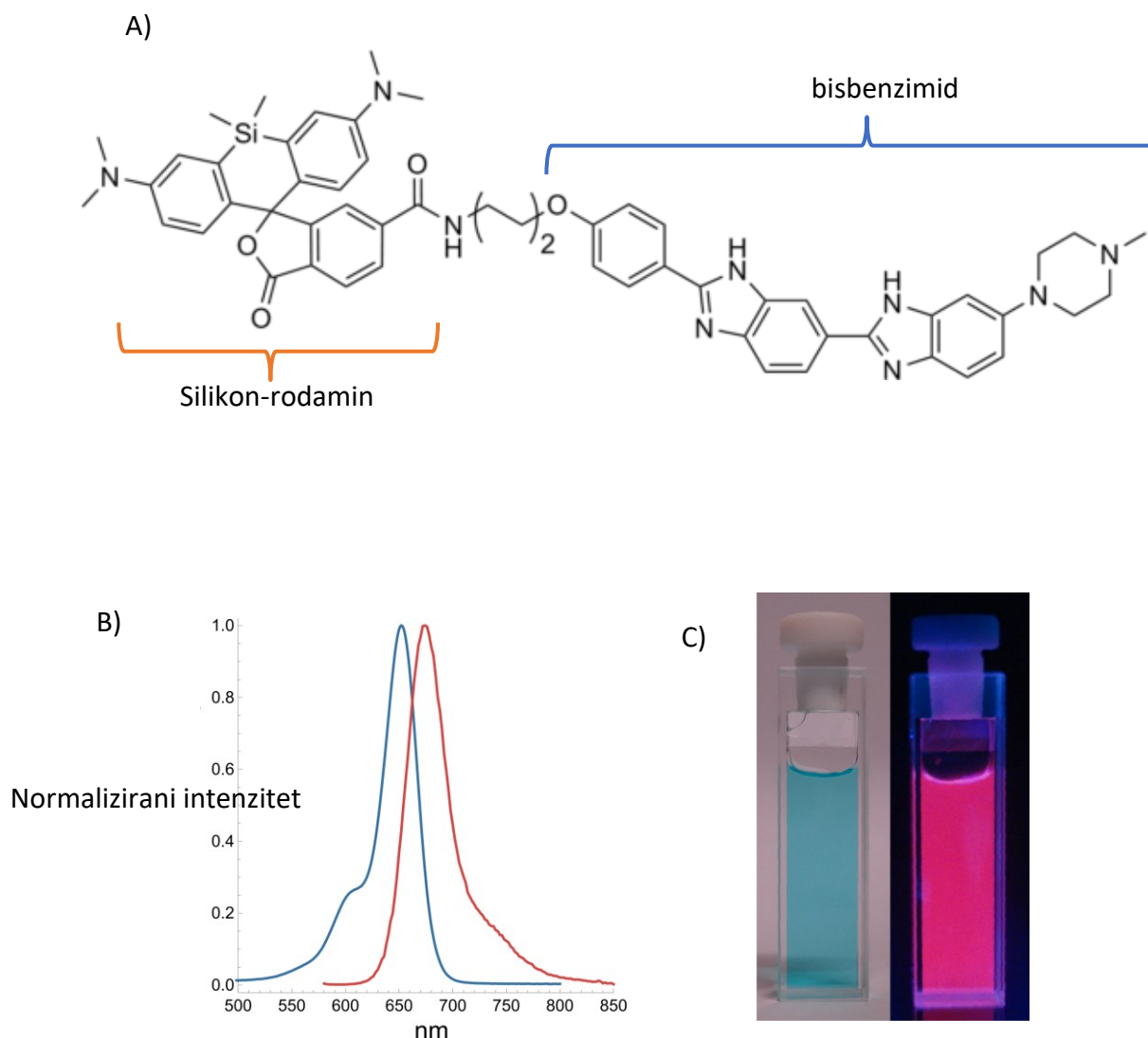


Slika 2.10. Dijagram Jablonskog. A) Fluorescencija. B) Fosforencija. Apsorpcija je prikazana ljubičastom strelicom, a radijativni prijelazi dani su krivudavom strelicom: interna konverzija zelenom, i vibracijska relaksacija plavom, a križna relaksacija smeđom. Radijativni prijelazi kojima molekula prelazi u niže stanje dani su crvenom (fluorescencija) i ružičastom (fluorescencija). Izvor: Preuzeto i obrađeno prema ref. 26

2.2.4. Fluorofori

Fluorofori su kemijski spojevi koji mogu fluorescirati nakon apsorpcije zračenja. U svojoj strukturi najčešće sadrže konjugirane dvostruke veze, aromatske skupine ili cikličke dijelove koji imaju π -sustav veza. Mogu se koristiti kao označivači u tekućinama, boje za određene strukture, supstrati u enzimima i sl. Ukoliko se kovalentno vežu na molekulu od interesa unutar stanice, moguće je na takav način tu molekulu vizualizirati mikroskopom. Neki od poznatih fluorofora su: fluorescein i njegov derivat fluorescein izotiocijanat (FITC), rodamin (TRITC) i cijanin. Njihovom derivatizacijom dobiveni su brojni fluorofori poboljšanih svojstava; fotostabilniji su, svijetle većim intenzitetom, manje su osjetljivi na pH i slično.²⁷

Primjer fluorescentne probe koja se koristi u modernoj mikroskopiji je boja za DNA na bazi silikonskog rodamina, SiR-DNA ili SiR-Hoechst. Silikon-rodamin apsorbira svjetlost valne duljine 652 nm, a emitira svjetlost valne duljine 674 nm, što ga čini iznimno pogodnim za stanice jer je infracrveni dio spektra manje štetan za druge makromolekule u stanicama. Silikon-rodamin kovalentno je vezan na bisbenzimid, spoj koji se specifično veže na manji utor DNA. Time se dobiva netoksična fluorescentna boja specifična za DNA. Dodatna posebnost ove boje je i što može proći kroz staničnu membranu i ne smeta diobu, pa se može koristiti za snimanje živih stanica.²⁸



Slika 2.11. SiR-DNA. A) Molekula SiR-DNA s naznačenim funkcionalnim dijelovima koji su vezani kovalentno. B) Apsorpcijski (plavo) i emisijski (crveno) spektar SiR-DNA. C) SiR-DNA boja prije (lijevo) i za vrijeme (desno) ekscitacije. Izvor: Preuzeto i obrađeno prema ref. 28

Drugi način da se molekule od interesa fluorescentno obilježe je korištenjem proteina koji imaju intrinzična fluorescencijska svojstva. Prvi takav otkriveni protein bio je zeleni fluorescentni protein GFP.²⁹

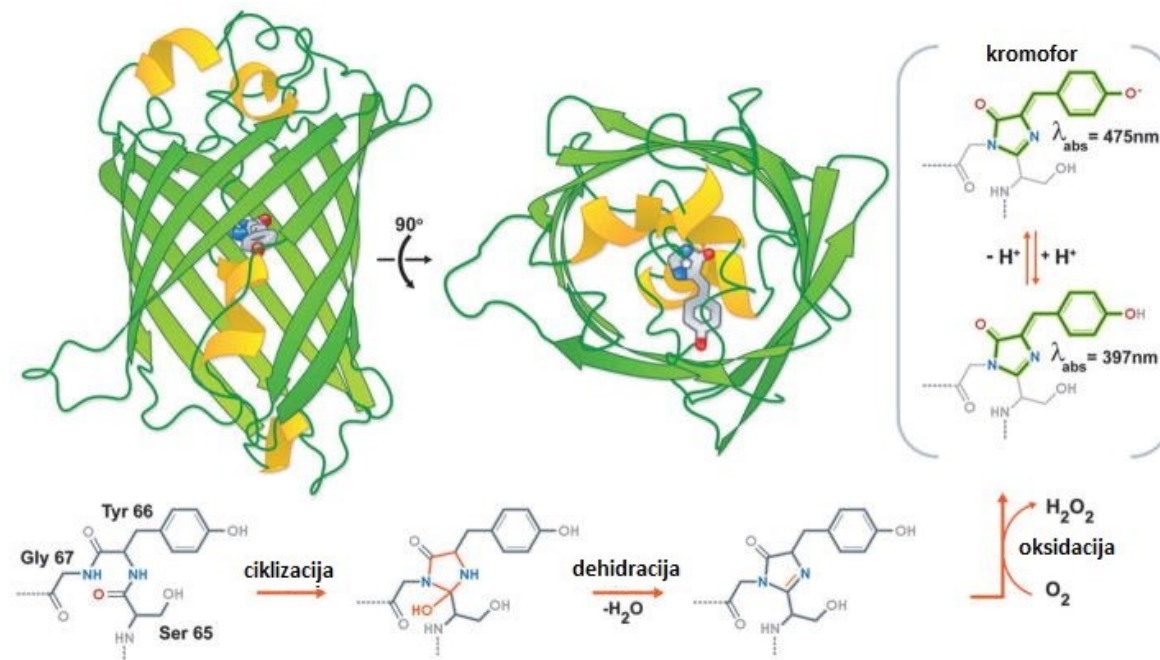
2.2.5. Zeleni fluorescentni protein (GFP) i njegovi derivati

Zeleni fluorescentni protein prvi put je izoliran 1962. iz meduze *Aequorea victoria* i sastoji se od 238 aminokiselina (slika 2.12). Pobuđuje se svjetlošću valnih duljina koje odgovaraju plavom i ultraljubičastom dijelu spektra (ekscitacijski maksimumi na 397 nm i 475 nm), a fluorescira pri 509 nm što odgovara zelenom dijelu vidljivog spektra.²⁹ Primjenjuje se u brojnim eksperimentima u

molekularnoj biologiji i biokemiji kao reporter ekspresije gena od interesa. Ukoliko se za unos gena u stanice koriste transgenične tehnike, može se zadržati u genetskom materijalu i prenositi kroz generacije, zbog čega je izrazito pogodan za stanične kulture.³⁰ Za otkriće GFP-a i razvoj metoda, 2008. je dodijeljena Nobelova nagrada.³¹

Na samoj sekvenci rađene su brojne modifikacije kako bi se dobila poboljšana verzija GFP-a, koja se brže i preciznije smata, manje je osjetljiva na fototoksične efekte snimanja koji dovode do degradacije i ima uže ekscitacijsko područje u spektru. Tako je danas najčešće korišten poboljšani GFP (engl. *enhanced GFP*, eGFP) otkriven 1995. godine.³⁰

Sam GFP ima strukturu β -bačve koja se sastoji od 11 β -ploča, a u središtu se nalazi α -zavojnica s kovalentno vezanim kromoforom. Bačva je gotovo savršeni cilindar, s promjerom 24 Å i visinom 42 Å i karakterističan je strukturni motiv za familiju proteina srodnih GFP-u. Na samim krajevima strukture nalaze se kratke α -zavojnice. Kromofor vezan na središnju α -zavojnicu je 4-(*p*-hidroksibenzildien)imidazolidin-5-on koji nastaje ciklizacijom i oksidacijom tripeptida Ser65–Tyr66–Gly67 (slika 2.12). β -bačva važna je jer onemogućava prodor vode i time gašenje fluorescencije. Također, okolni aromatski i ionski bočni ogranci omogućuju delokalizaciju elektrona i stabilizaciju naboja.³⁰



Slika 2.12. Zeleni fluorescentni protein GFP. Zelenom je prikazana β -bačva s jedanaest β -ploča, a žutom α -zavojnica koja kovalentno veže kromofor 4-(*p*-hidroksibenzildien)imidazolidin-5-on koji je spontano nastao iz tripeptida Ser65–Tyr66–Gly67. Preuzeto i obrađeno prema ref. 30

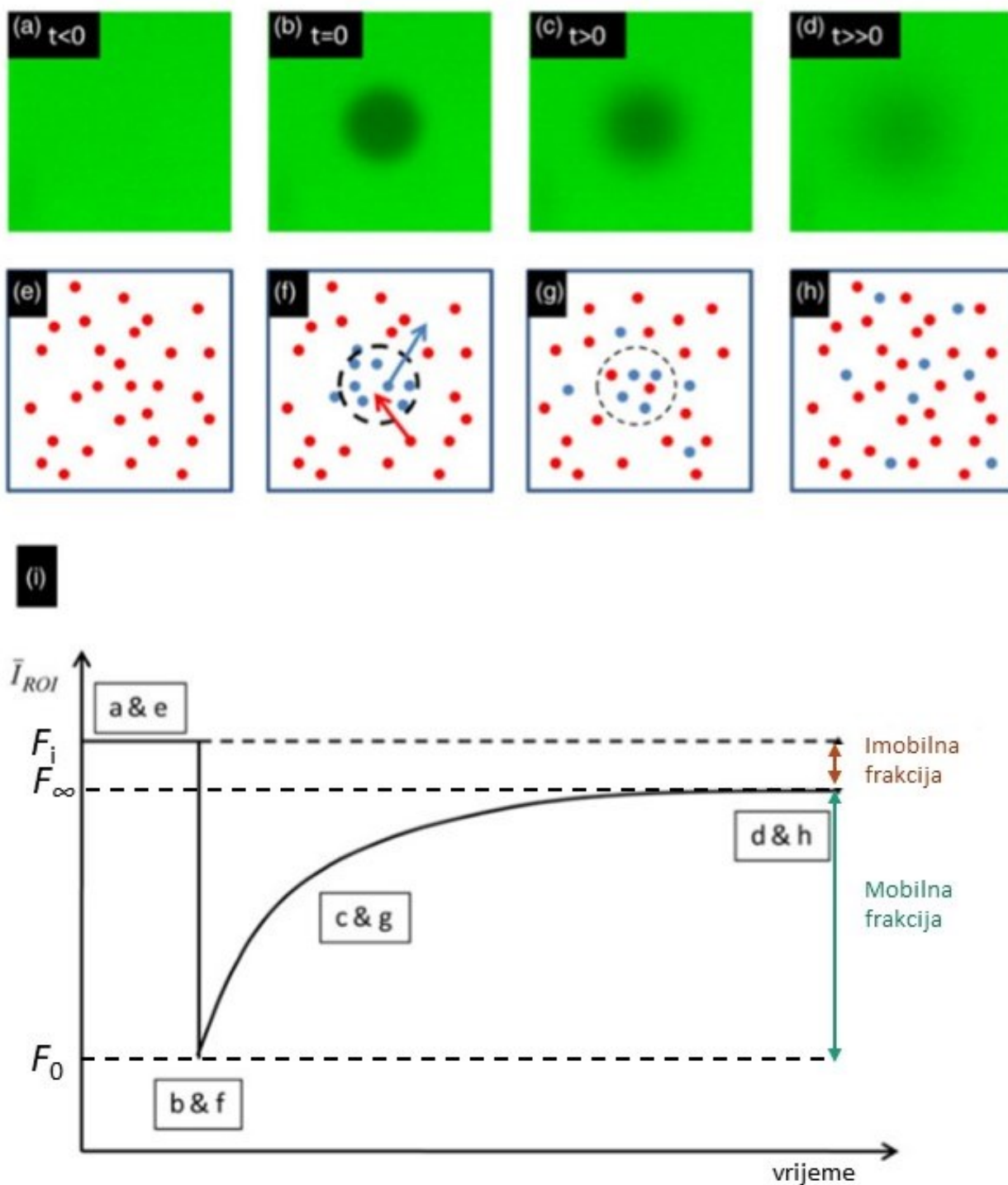
2.3. Princip FRAP-a i teorija

2.3.1. Oporavak fluorescencije nakon fotoizbljeđenja, FRAP

Iako su današnji fluorofori koji su u čestoj uporabi u staničnoj biologiji jako uznapredovali, ipak i dalje može doći do kemijske modifikacije fluorofora što dovodi do gubitka fluorescencije. Neki od razloga su nastanak reaktivnih kisikovih radikala uslijed snimanja, interakcije s molekulama i sl. Sam mehanizam uključuje multifotonske reakcije i nije do kraja objašnjen. Efekt gubitka fluorescencije uslijed takve degradacije fluorofora naziva se fotoliza boje ili fotoizbljeđenje (engl. *photobleaching*). Iako se čini kao nepoželjna pojava, promišljenim eksperimentom mogu se dobiti brojne informacije iz efekata fotoizbljeđenja. Ukoliko je fluorofor, kovalentno vezan na molekulu interesa u stanici, izložen djelovanju laserskog snopa visokog intenziteta na vrlo uskoj regiji, on će fotoizbljediti. Ako je ekscitacija trajala kratko, molekula od interesa može zadržati funkciju, samo ju se ne može opaziti na mikroskopu. Ukoliko je ta molekula mobilna u stanici, ona će se zamijeniti drugom koja ima funkcionalan fluorofor. Metoda koja se bazira na opisanoj ideji razvijena je 1970.-tih i naziva se **oporavak fluorescencije nakon fotoizbljeđenja** (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP). **FRAP** je često korištena metoda u molekularnoj biologiji i biofizici kako bi se proučavala dinamika molekula od interesa u stanici na kratkoj vremenskoj skali bez utjecaja na brojnost molekula i kemijsku ravnotežu reakcija.³²

FRAP je često korištena metoda za proučavanje difuznih i interakcijskih svojstava tvari u biološkim uzorcima i uzorcima materijala. Da bi se razumjeli mehanizmi koji kontroliraju mobilnost tvari u mediju, potrebno je proučiti odnos strukture, interakcija i difuzije. Posebnost FRAP-a je što se pomoću gašenja fluorescencije dobiju dvije različite frakcije molekula od interesa, no njihova struktura, kao i svojstva interakcije i difuzije nisu značajno narušena. Time se može proučavati ravnotežne reakcije direktno u stanici na mikroskali.³²⁻³⁵

Sam koncept metode prilično je jednostavan (slika 2.13). Fluorescentno obilježene molekule ireverzibilno se izbljede djelovanjem ekscitacijskog snopa velikog intenziteta na maloj regiji od interesa, ROI. Rezultat koji se opaža mikroskopom je pad intenziteta fluorescencije na ROI. Ukoliko postoje mobilne molekule u okolini ROI koje nisu izgubile svojstvo fluorescencije, one će zamijeniti fotoizbljeđene molekule, na način da će difuzijom jedne ući u ROI, a druge izaći. Do koje mjere će se opraviti fluorescencija ovisi o mobilnosti molekula. Taj porast intenziteta u ROI može se pratiti u vremenu i dobiva se krivulja oporavka.³²⁻³⁵



Slika 2.13. Princip FRAP-a. (a)-(d) – eksperiment u glicerolu. (e)-(h) – događaji na molekularnom nivou. Fluorescentno obilježene molekule prikazane su crvenom, a molekule nakon fotoizbljeđenja prikazane su plavom. (i) – krivulja koja se dobije praćenjem intenziteta fluorescencije u ROI. Preuzeto i obrađeno prema ref. 32

Pomoću prikladnog matematičkog modela, moguće je dobiti informacije o udjelu mobilnih i imobilnih molekula. Za korektan izračun ključne su tri informacije: početni intenzitet u ROI u $t < 0$ s, F_i , vrijednost odmah nakon djelovanja ekscitacijskog snopa u $t = 0$ s, F_0 , te maksimuma oporavka, F_∞ . Mobilna frakcija, M računa se prema izrazu (1), a imobilna frakcija, IM prema (2). Da bi se dobile točne vrijednosti, potrebno je razumjeti kinetički model difuzije i interakcija.^{32-35,39}

$$M = \frac{F_\infty - F_0}{F_i - F_0} \quad (1)$$

$$IM = \frac{F_i - F_\infty}{F_i - F_0} \quad (2)$$

2.3.2. Difuzija u otopinama

Da bi se potpuno razumio FRAP, nužno je uvesti difuziju. Difuzija se definira kao proces u kojem se čestice u plinovima, tekućinama i krutinama šire u svim smjerovima, bez ulaganja energije, tj. pasivnim transportom. Makroskopsko opažanje je da se sustav ne mijenja, no zapravo je u termodinamičkoj ravnoteži. Potrebni izrazi dani su Fickovim zakonima. Prvi zakon je relacija difuzijskog toka i koncentracije tvari u uvjetima 'steady state' dana za 1D³²:

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (3)$$

gdje je J difuzijski tok, D difuzijska konstanta, c koncentracija, a x pozicija. Difuzijska konstanta može se procijeniti pomoću Stokes-Einsteinove relacije za kuglu u tekućini:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

Gdje je k_b Boltzmannova konstanta, T apsolutna temperatura, η viskoznost tekućine, a r radijus kuglice. Drugi Fickov zakon govori o tome kako difuzija može promijeniti koncentraciju tvari na poziciji x u vremenu t .

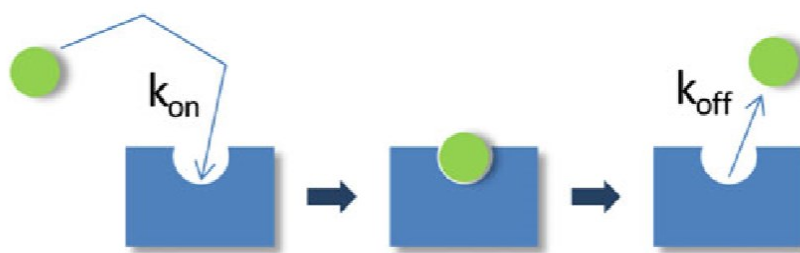
$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2} \quad (5)$$

U 3D potrebno je uvesti Laplaceov operator koji generira drugu derivaciju varijable³².

$$\frac{dc}{dt} = D \nabla^2 c \quad (6)$$

2.3.3. Kinetički model

Poseban slučaj difuzije u otopinama je prisutnost veznog mjesta za molekule koje difundiraju (slika 2.14). Slobodna molekula difundira u otopini i u jednom trenutku se nađe u blizini veznog mjesta. Koeficijent brzine vezanja dan je kao k_{on} , a koeficijent brzine povratne reakcije dan je s k_{off} .³⁴



Slika 2.14. Vezanje slobodne molekule na vezno mjesto. Slobodna molekula (zeleno) veže se na slobodno vezno mjesto u otopini (plavo). Nakon nekog vremena se nastali kompleks razdvaja na slobodnu molekulu i prazno vezno mjesto za drugu molekulu. Preuzeto i obrađeno prema ref. 32

Za proučavanje kinetike FRAP-a potrebno je uvesti hipotetsku jednadžbu koja uključuje jedno vezno mjesto molekule od interesa:



gdje F predstavlja brojčanu koncentraciju slobodnih molekula u otopini, S broj slobodnih veznih mjesta, a kompleks $[FS]$ dan je kao C . Cijela kinetička jednadžba treba sadržavati i difuzijski član te se za svaki član dobije:

$$\frac{\partial f}{\partial t} = D_f \nabla^2 f - k_{on} f s + k_{off} c \quad (7)$$

$$\frac{\partial s}{\partial t} = D_s \nabla^2 s - k_{on} f s + k_{off} c \quad (8)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + k_{on} f s - k_{off} c \quad (9)$$

Ove jednadžbe mogu se pojednostaviti uzimajući u obzir biološke uvjete za vrijeme FRAP-a. Prvo pojednostavljenje odnosi se na pretpostavku da je sustav na kojem izveden eksperiment u termodinamičkoj ravnoteži. Za proteine od interesa na koje je vezan GFP to bi značilo da im je na vremenskoj skali eksperimenta broj konstantan. Ta pretpostavka je opravdana jer se FRAP većinom odvija na manje od minute, a ekspresija proteina u stanici se mijenja na vremenskoj skali od nekoliko

sati. Iako samo fotoizblijeđenje u $t = 0$ s mijenja broj slobodnih i vezanih proteina koji se mogu vidjeti, broj vezanih mjesta ostaje konstantan, $s = S_{eq}$. Time se eliminira jednadžba (8), a u preostale dvije jednadžbe varijabla s postaje konstanta S_{eq} . Kao rezultat, može se definirati koeficijent pseudo-prvog reda $k_{on}^* = k_{on}S_{eq}$.³⁴

Drugo važno pojednostavljenje koje vrijedi u većini bioloških situacija je da su vezna mjesta S i nastali kompleksi F dio većeg, relativno imobilnog kompleksa ili organela, barem na vremenskoj i veličinskoj skali bitnoj za FRAP. Ovo je široko primjenjivo primjerice za proteine citoskeleta ili one vezane na DNA. Time je i $D_c = 0$ i dobiju se izrazi:

$$\frac{\partial f}{\partial t} = D_f \nabla^2 f - k_{on}^* f + k_{off} c \quad (10)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = k_{on}^* f - k_{off} c \quad (11)$$

Prije fotoizblijeđenja, sustav je u termodinamičkoj ravnoteži, broj slobodnih proteina je F_{eq} i nastalih kompleksa je C_{eq} , time je omjer slobodnih i vezanih molekula dan s:

$$\frac{df}{dt} = \frac{dc}{dt} = 0 \rightarrow k_{on}^* F_{eq} = k_{off} C_{eq} \quad (12)$$

Ravnoteža dana ovim izrazima nije izmijenjena djelovanjem fotoizblijeđenja, promijenio se samo broj molekula koje se mogu i ne mogu vidjeti. Točnije, fotoizblijeđene molekule nalaze se u ROI trenutak nakon fotoizblijeđenja, i ukoliko postoji mobilna frakcija u stanici, mogu se zamijeniti s molekulama koje nisu fotoizblijeđene. Podaci koji se mjere odgovaraju uprosječenom intenzitetu fluorescencije vezanih i inevezanih molekula:

$$FRAP(t) = avg(f(t)) + avg(c(t)) \quad (13)$$

Eksperimentalni podaci trebaju se normalizirati na način da vrijednosti FRAP-a idu od 0 do 1, za svaku stanicu posebno. To je ključno jer različite stanice mogu imati različitu ekspresiju proteina. Od eksperimentalnih pretpostavki, ključno je da ovi izrazi vrijede za kružni ROI koji je relativno malen u odnosu na stanicu. Ukoliko se krivulja usporedi s krivuljom dobivenom teorijskim modelom, može se opisati sustav. Najjednostavniji model uključuje pretpostavku da difuzija nije ključna, tj. da brzina kemijske interakcije ovisi o brzini vezanja na slobodno mjesto. Takav model u literaturi je poznat kao **reakcijski model** (14)³²⁻³⁵.

$$\frac{\partial f}{\partial t} = -k_{on}^* f + k_{off} c \quad (14)$$

Uvođenjem supstitucija, $A = \frac{k_{off}}{k_{on}^* + k_{off}}$ i $b = k_{on}^* + k_{off}$, može se riješiti diferencijalna jednačina i dobije se funkcija (15):

$$f(t) = A(1 - e^{-bt}) \quad (15)$$

Budući da ROI u eksperimentalnim uvjetima neće fotozbljediti na vrijednost 0, jednačina koja se koristi za model prema FRAP eksperimentu uključuje i parametar F_0 (16).

$$f(t) = FRAP(t) = F_0 + A(1 - e^{-bt}) \quad (16)$$

Pomoću parametra b može se dobiti vrijeme polureakcije FRAP-a, $\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{b}$, tj. vrijeme potrebno da intenzitet fluorescencije bude $\frac{A}{2}$. $\tau_{1/2}$ u biološkom kontekstu nema konkretno značenje ukoliko nije ispitano više kinetičkih modela, ali može poslužiti kao praktična mjera za usporedbu rezultata dobivenih unutar eksperimenata koji su izvedeni u istim uvjetima.³²⁻³⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Uzgoj stanica

Za provođenje eksperimenta korištena je ljudska tumorska stanična linija HeLa-Kyoto BAC sa stabilnom ekspresijom proteina PRC1 obilježenog zelenim fluorescentnim proteinom (u daljnjem tekstu: **HeLa PRC1-GFP**). Stanice su rasle u DMEM mediju (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Basel, Švicarska) u koji je dodano 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a (engl. *fetal bovine serum*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 50 µg/mL geneticina (Life Technologies, Waltham, MA, SAD), 100 µg/mL penicilina (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i 100 µg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich). Stanice su uzgajane na 37°C i 5 % CO₂ u inkubatoru Galaxy 170S (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Ovako pripremljen medij za održavanje stanica prethodno je filtriran.

Kulture stanica su presađivane svakih 48-72 sata kada je dosegnuta konfluentnost. Prvo je uklonjen medij i stanice su isprane s 5 mL sterilnog 1% PBS pufera (engl. *phosphate-buffered saline*). Zatim se stanice odvojene od podloge dodavanjem 1 mL 1%-tne otopine tripsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i inkubiranjem 5 minuta na 37 °C. Odlijepljene stanice pomiješane su s 2 mL medija i potom je 500 µL homogenizirane smjese dodano u novu posudu za uzgoj u koju je prethodno dodano 10 mL svježeg DMEM hranjivog medija. Kulture stanica održavane su u inkubatoru (Galaxy 170s, Eppendorf, Hamburg, Germany) pri 37 °C i 5% CO₂.

Sastav PBS pufera (1%):

8,0 g/L NaCl

0,2 g/L KCl

1,42 g/L Na₂HPO₄

0,24 g/L KH₂PO₄

pH 7,4

3.1.2. Priprema uzorka za mikroskopiranje

Uz prethodno opisani postupak presađivanja stanica pripremljeni su i uzorci za mikroskopiranje. Nakon što je neutralizirano djelovanje tripsina dodatkom 2 mL DMEM medija sa suplementima, određeni volumen medija sa stanicama (100 - 200 μ L, ovisno o konfluentnosti) dodan je u posudice za mikroskopiranje. U posudice je prethodno dodano 2 mL medija za uzgoj stanica. Korištene su plastične posudice za mikroskopiranje koje na dnu imaju staklo promjera 35 mm i debljine 1,5 mm (MatTek Corporation, Ashland, SAD). Pripremljene stanice čuvane su pri i 5% CO₂.

Nakon 24 sata ukonjenje DMEM hranjivi medij i dodan L-15 (Leibovitz) medij za mikroskopiranje (Life Technologies). Pritom je i u L-15 medij dodano 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 50 μ g/mL geneticina, 100 μ g/mL penicilina i 100 μ g/mL streptomicina. Ovaj medij omogućuje rast stanica u okolini u kojoj količina CO₂ nije kontrolirana. Također, ne sadrži autofluorescentne indikatore kiselosti, te je pogodan za fluorescencijsku mikroskopiju. Nekoliko sati nakon dodatka L-15 medija i 20 min prije snimanja, stanicama je dodana boja za vizualizaciju kromosoma SiR-DNA (SC007, Spirochrome AG, Stein am Rhein, Švicarska; Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, SAD). Direktno u 2 mL medija dodano je 0,2 μ L boje ($c = 50 \mu\text{mol} / \text{L}$). Stanice su tim postupcima spremne za mikroskopiranje.

3.1.3. Mikroskopiranje

Stanice su snimane Leica TCS SP8 FILM konfokalnim mikroskopom s Leica HC PL APO 63x/1.40 CS2 uljnim imerzijskim objektivom (Leica, Wetzlar, Njemačka). Objektiv se nalazi unutar komore za zagrijavanje H101-1x35-PRIOR-NZ100 (Okolab, Pozzuoli, Italija) koja osigurava pogodnu temperaturu za dijeljenje stanica, tj. 37 °C. Budući da su snimane stanice HeLa PRC1-GFP s dodatkom SiR-DNA, odabrane su pobudne laserske linije valnih duljina 488 nm i 640 nm.

Da bi se utvrdila faza mitoze, snimljena je jedna, središnja ravnina svake stanice prije FRAP eksperimenta. Pritom su laseri bili na 20 % (488 nm) i 30 % (640 nm) jakosti, a korišteni su hibridni detektori. FRAP eksperiment izveden je na način da je snimljen samo kanal za GFP. Interval snimanja bio je 0,433 s. Prije fotoizblijedenja stanica je snimljena 4 puta, a poslije 50 do 100 puta, ovisno o pomaku stanice u vidnom polju. Argonski laser pritom je bio na 20 % jakosti. Fotoizblijedenje je načinjeno tako što je argonski laser bio podešen na 100 % jakosti. Odabran je kružni ROI površine 1,6-1,7 μm^2 . Fotoizblijedenje ponovljeno je 6 puta, također u intervalu od 0,433 s. Time je dobivena snimka za analizu.

3.2. Analiza snimki

Analiza snimaka napravljena je u programu *ImageJ* (National Institute of Health, Bethesda, MD, SAD) specijaliziranom za obradu snimki dobivenih na mikroskopu. Na svim slikama naznačena je skala u μm . Za kvantifikaciju podataka, statističku analizu i generiranje grafičkih prikaza korišten je *MatLab* (MathWorks, Natick, SAD).

3.2.1. Profil intenziteta i signal PRC1-GFP

Profili intenziteta signala PRC1-GFP određeni su korištenjem alata *Line tool* u programu *ImageJ*. Linija je nacrtana okomito na glavnu os diobenog vretena. Duljina linije iznosila je 12-20 piksela, ovisno o eksperimentu. Intenzitet signala PRC1-GFP određen je pomoću alata *Oval selections*. Odabran je ROI promjera $\sim 1 \mu\text{m}$ na vretenu kako bi se odredio pripadni signal i odmah pokraj vretena, na način da je novi ROI odabran uz obod prethodnog, kako bi se odredio signal u citoplazmi.

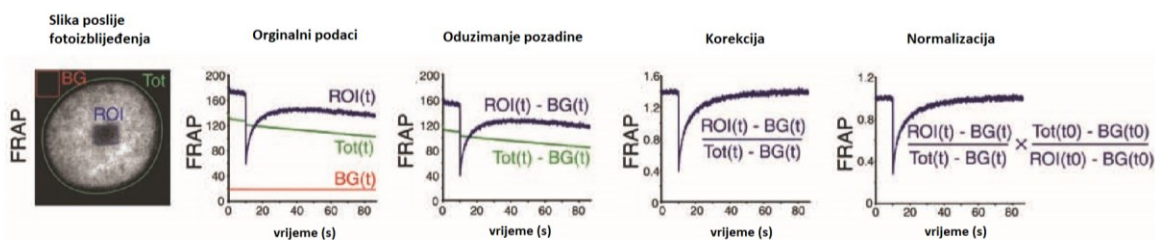
Vrijednosti intenziteta signala dane su kao proizvoljne jedinice (engl. *arbitrary unit*, a.u.). Budući da vrijednosti ovise o ekspresiji proteina, uspješnosti vezanja i koncentraciji antitijela, postavkama snimanja i sl., moguće je usporediti samo vrijednosti u eksperimentima gdje su uzorci pripremljeni, te snimljeni na identičan način, što je bio slučaj u ovom radu. Sve dane vrijednosti u tekstu dane su kao (srednja vrijednost \pm srednja standardna pogreška srednje vrijednosti, SEM). Ukoliko je bilo potrebno, statističke razlike između dva skupa podataka određene su neuparenim Welchovim *t*-testom. Razlika između uzoraka smatrana je značajnom ukoliko je *p*-vrijednost bila manja od 0,05.

3.2.2. Analiza FRAP-a

Analiza dobivenih snimki je napravljena prema protokolu iz literature.³⁵ Pomoću alata *Oval selections* odabran je ROI površine $1,7 \mu\text{m}^2$ koji odgovara mjestu FRAP-a i izmjeren je prosječan signal (engl. *mean intensity*) u svim vremenskim točkama. Budući da ROI sadržava i pozadinsku fluorescenciju koja potječe od medija, pokrova posudice, objektiva i sl., potrebno je signal pozadine izvan stanice (engl. *background*, BG) oduzeti od signala ROI u svim vremenskim točkama. Osim toga, fluorescencijska mjerenja van ROI trebala bi biti linearna funkcija u vremenu koja odgovara koncentraciji fluorofora, no to nije tako. Glavni su razlozi fluktuacije u intenzitetu lasera i fotoizblijedenje van ROI. Stoga je potrebno napraviti korekciju; na signal cijele stanice ili na signal regije kojoj se intenzitet ne mijenja (npr. susjedna stanica u interfazi). Korekcija se radi na način da se signal ROI u svakoj vremenskoj točki podijeli sa signalom cijele stanice ili regije sa stabilnim signalom (TOT). Prethodno je i signalu ROI i signalu za korekciju oduzet BG mjeren izvan stanice pomoću *Rectangle tool* kvadratića dimenzija $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ u programu *ImageJ*.^{35,39}

Da bi podaci iz različitih eksperimenata bili usporedivi međusobno, potrebno je korigiranu vrijednost za ROI normalizirati. Za FRAP eksperimente to se radi na način da se vrijednosti u svim točkama podijeli s vrijednošću u prvoj vremenskoj točki prije fotoizblijedenja (t_{PB}) prema formuli (17). Grafički sažetak analize dan je na slici 3.1.

$$FRAP_{norm}(t) = \frac{ROI(t) - BG(t)}{TOT(t) - BG(t)} \times \frac{TOT(t_{PB}) - BG(t_{PB})}{ROI(t_{PB}) - BG(t_{PB})} \quad (17)$$



Slika 3.1. Koraci za analizu eksperimentalnih podataka u FRAP eksperimentu. Vrijeme t_0 odgovara t_{PB} . Preuzeto i obrađeno prema ref. 35.

3.2.3. Modeliranje FRAP-a

Pretpostavljeni kinetički model je prilagođen (engl. *fitting*) na podatke nelinearnom regresijom metodom najmanjeg kvadrata, te su dobivene vrijednosti parametara A i b (16). Pritom je korištena *Curve Fitting Toolbox*³⁶ opcija u MatLabu. za rješavanje normalnih jednadžbi korišten je Levenberg-Marquardtov algoritam. Kao F_0 vrijednost uzeta je srednja vrijednost eksperimentalnih podataka u $t = 0$ s. Prilikom modeliranja, moguće je evaluirati kvalitetu slaganja modela i eksperimentalnih podataka (engl. *goodness of fitting*). Za svaki parametar računa se i interval pouzdanosti od 95 %.

Unutar *Curve Fitting Toolbox* opcije moguće je evaluirati kvalitetu slaganja metodama: sume kvadrata u odnosu na grešku (engl. *sum of squares due to error*, SSE), R^2 (engl. *R-Square*) prilagođenog R^2 (enlg. *Adjusted R-Square*) i korijena srednje pogreške kvadrata (engl. RMSE). SSE je statistika koja mjeri ukupnu razliku između n eksperimentalnih (y_i) i teorijskih ($f(x_i)$) zavisnih varijabli (18). Što je dobivena vrijednost bliža 0, slaganje je bolje³⁷.

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2 \quad (18)$$

R^2 pokazuje koliko uspješno model objašnjava varijacije u podacima. Dobiva se izrazom (19) :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{SSE}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (19)$$

gdje je \bar{y} srednja vrijednost svih eksperimentalnih zavisnih varijabli, $\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i$. Time se dobiva broj između 0 i 1. Smatra se da model kvalitetnije opisuje eksperimentalne podatke što je broj bliže 1. Ukoliko se uspoređuje više sekvencijalnih modela, tj. modela u kojima se doda jedan parametar više u odnosu na prethodni, poželjno je koristiti prilagođeni R^2 jer se tada uzima u obzir broj stupnjeva slobode, koji odgovara razlici n i broja parametara.

Još jedan od načina procjene je i RMSE (20):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (f(x_i) - y_i)^2}{n}}$$

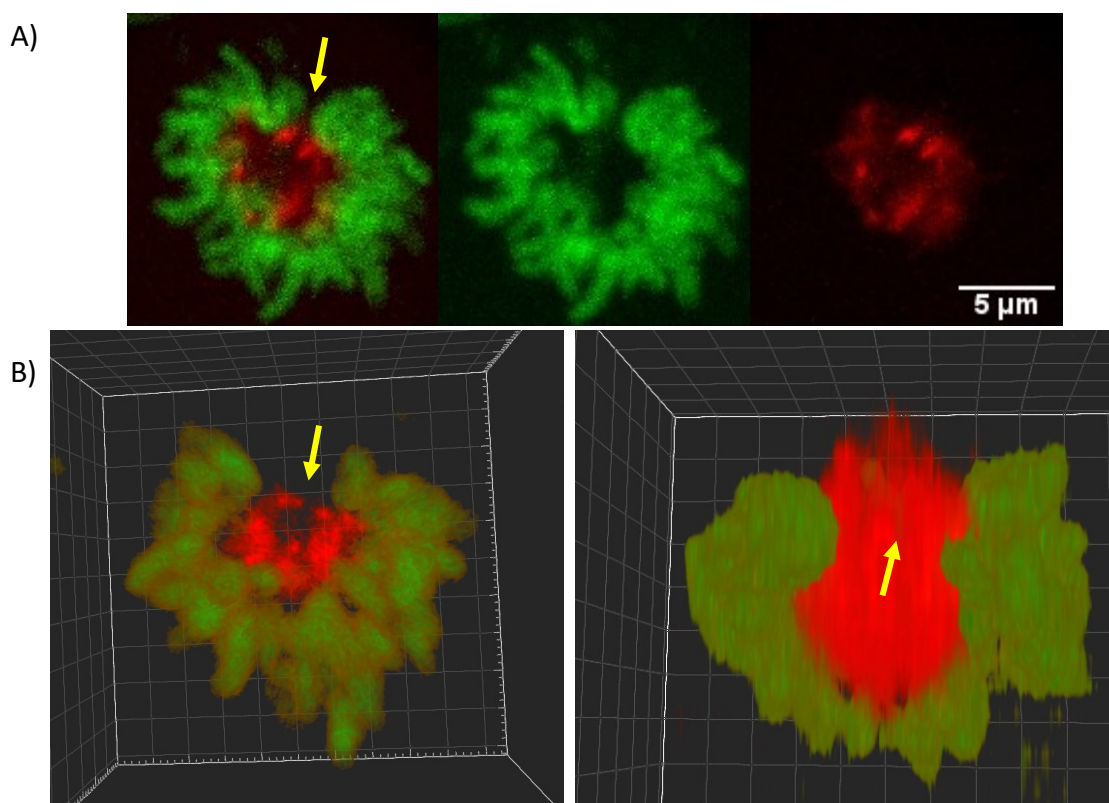
Slično kao i SSE, rezultat bliži 0 sugerira bolje slaganje eksperimentalnih i teorijskih podataka.³⁷

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Lokalizacija PRC1-GFP u fazama mitoze i karakterizacija svežnja mikrotubula

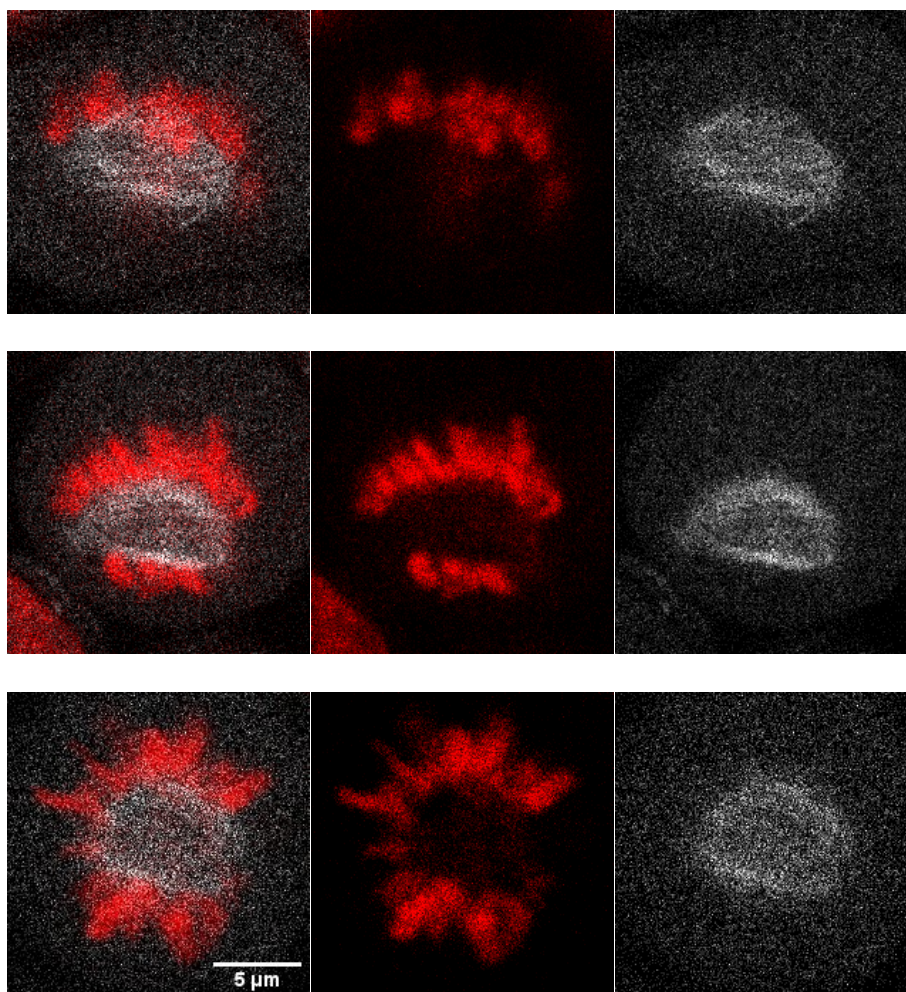
4.1.1. Lokalizacija u prometafazi

Stanice HeLa PRC1-GFP proučavane su fluorescencijskim mikroskopom nakon dodatka SiR-DNA u svim fazama mitoze. Uočeno je da na početku mitoze, u ranoj prometafazi PRC1-GFP lokalizira u prstenu između kromosoma i pritom nije moguće jasno razlučiti pojedine svežnjeve mikrotubula. Slika 4.1. prikazuje originalnu sliku s mikroskopa (4.1.A) i 3D prikaz vretena u ranoj prometafazi (4.1.B). U ranijoj fazi prsten kromosoma nije do kraja zatvoren i moguće je uočiti jednu ili dvije regije intenzivnijeg signala koje bi odgovarale djelomično formiranom antiparalelnom svežnju mikrotubula obilježenom s PRC1-GFP.



Slika 4.1. Morfologija diobenog vretena u ranoj prometafazi. A) Maksimalna projekcija svim ravnina u kojima je moguće uočiti vreteno. U stanicama HeLa obilježeni su PRC1-GFP (crveno) i SiR-DNA (zeleno). B) 3D prikaz vretena. Žuta strelica prikazuje dva potencijalna antiparalelna svežnja i rozetu kromosoma koja se nije u potpunosti zatvorila. Duljina kvadratića na slici je 1 µm. Sliku je snimio student Jurica Matković.

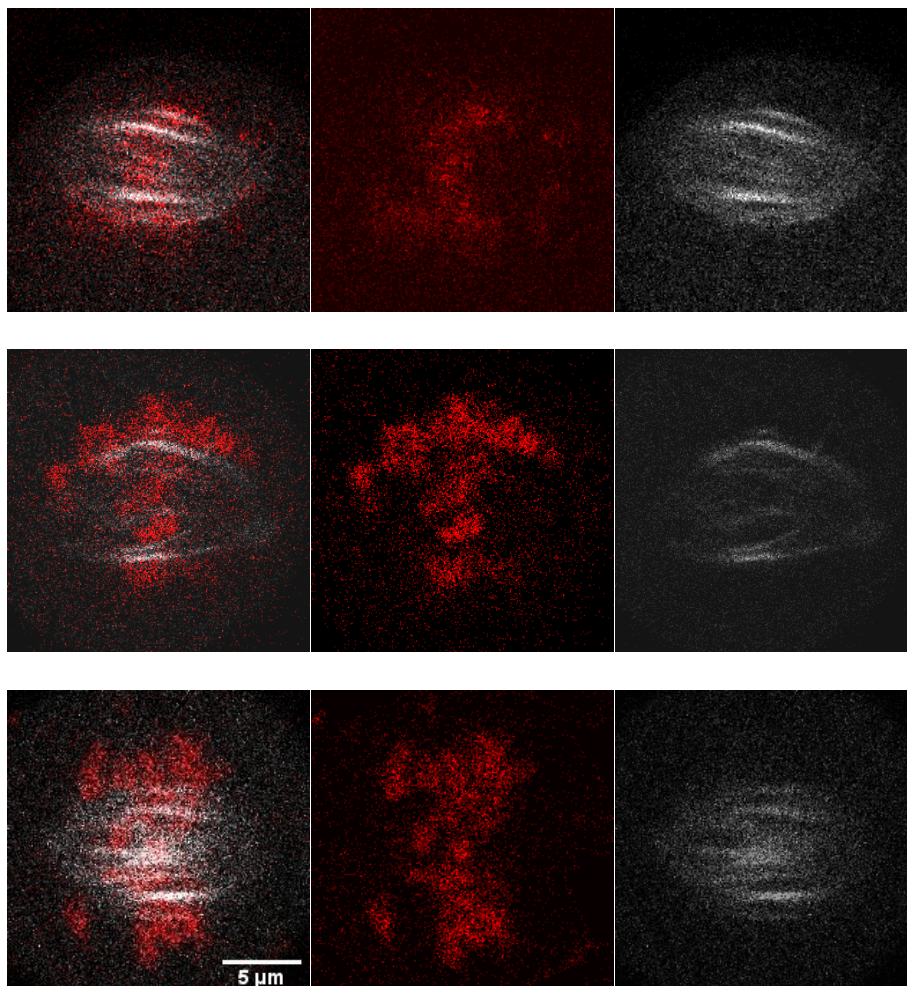
Prilikom snimanja na mikroskopu bilo je moguće uočiti stanice koje su u vidnom polju bile položene na način da odgovara presjeku u xy-ravnini 3D prikaza (slika 4.1.A). Takvo vreteno, u slučaju da se stanica nije rotirala u vidnom polju, imalo je polove položene okomito u odnosu na stakalce. Iz tog razloga u ovom radu naziva se vretenom u vertikalnom položaju. Također, bilo je moguće uočiti vretena kojima su polovi položeni paralelno u odnosu na stakalce i takva vretena nazivaju se vretenima u horizontalnom položaju (slika 4.2). Budući da su se promjene u signalu PRC1-GFP izrazito brzo događale i bilo ih je moguće uočiti na mikroskopu unutar nekoliko sekundi, slike faza u nastavku rada su lošije kvalitete jer je snimljena samo jedna, središnja ravnina.



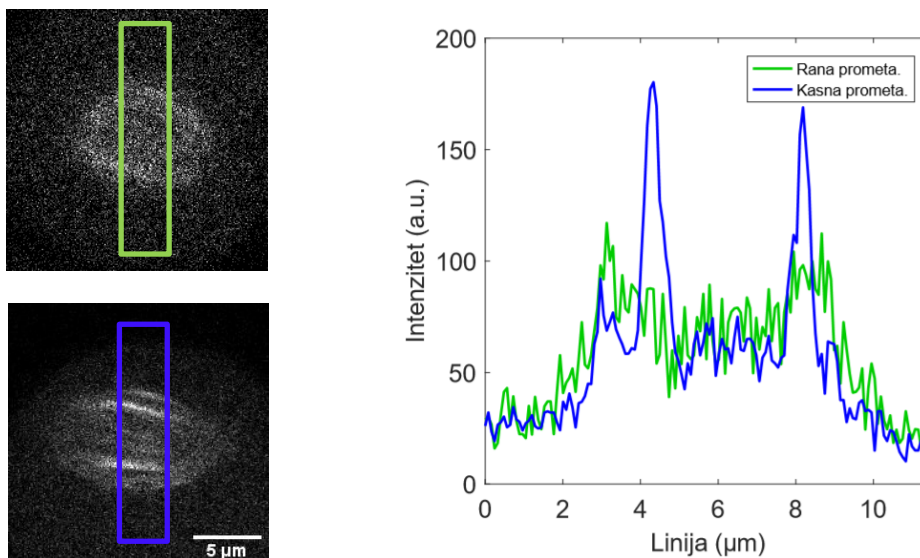
Slika 4.2. Mitotsko vreteno u ranoj prometafazi u horizontalnom položaju. SiR-DNA (crveno) i PRC1 GFP (bijelo). Prikazane tri različite stanice u istoj fazi. Skala je na svim slikama 5 μm .

Ukoliko se vreteno vizualiziralo 2-3 min nakon faze prikazane na slici 4.2. (u daljnjem tekstu **rana prometafaza**), opaženi su donekle formirani svežnjevi mikrotubula (slika 4.3, u daljnjem tekstu **kasna prometafaza**). Profil intenziteta PRC1-GFP signala pokazao je uske maksimume koji odgovaraju položaju formiranog svežnja (slika 4.4). U ranoj prometafazi nije bilo moguće uočiti takve

maksimume i stoga se pretpostavlja da se u procesu prometafaze relativno ravnomjerno rasprostranjeni PRC1-GFP, veže na mikrotubule dovoljno stabilnim interakcijama da ih je moguće opaziti na mikroskopu, no još uvijek nisu formirani čvrsti svežnjevi mikrotubula.

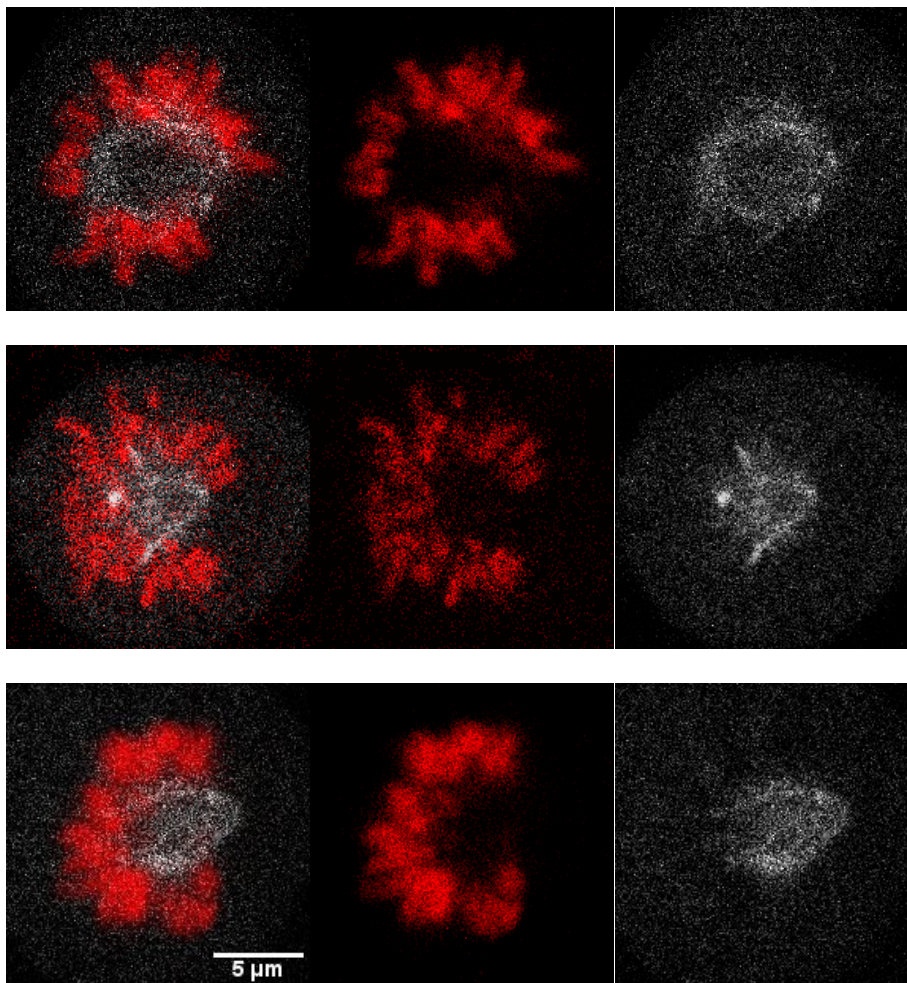


Slika 4.3. Mitotsko vreteno u kasnoj prometafazi u horizontalnom položaju. SiR-DNA (crveno) i PRC1 GFP (bijelo). Prikazane tri različite stanice u istoj fazi. Skala je na svim slikama 5 μm .

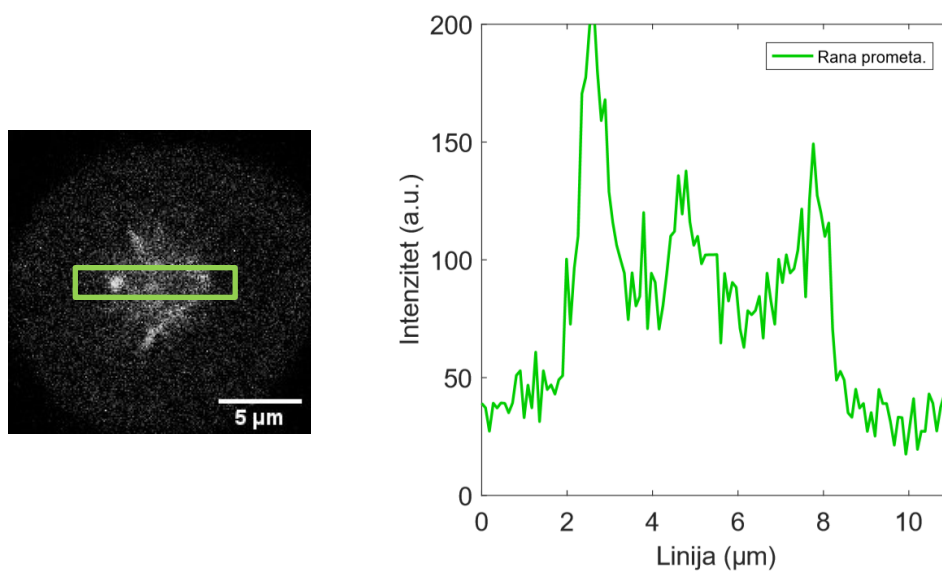


Slika 4.4. Profil intenziteta signala PRC1-GFP u ranoj prometafazi u magličastoj formi (zeleno) i kasnoj prometafazi u svežnju (plavo). Skala je na svim slikama 5 µm. Profil je širok 20 piksela.

Vretena u vertikalnom položaju pokazala su da raspodjela signala ipak nije uniformna, već da u pravilu postoje jedna ili dvije regije intenzivnijeg signala koje bi odgovarale svežnju (slika 4.5). Da je bilo riječ o svežnju koji je po intenzitetu maksimuma sličan onom u kasnoj prometafazi, pokazao je i profil intenziteta (slika 4.6). Naizgled u vretenu postoje dvije različite forme: jedna koja intenzitetom odgovara donekle formiranom svežnju i druga u kojoj je maksimum signala niži i širi. Druga forma ima magličast izgled i pretpostavlja se da je riječ o frakciji PRC1 koja nije vezana jakim interakcijama na vreteno. Da bi se ispitala biofizikalna svojstva takvih formi, potrebna je metoda koja će dati odgovor na sekundnoj skali jer se na toj skali uočavaju promjene u arhitekturi vretena u prometafazi.



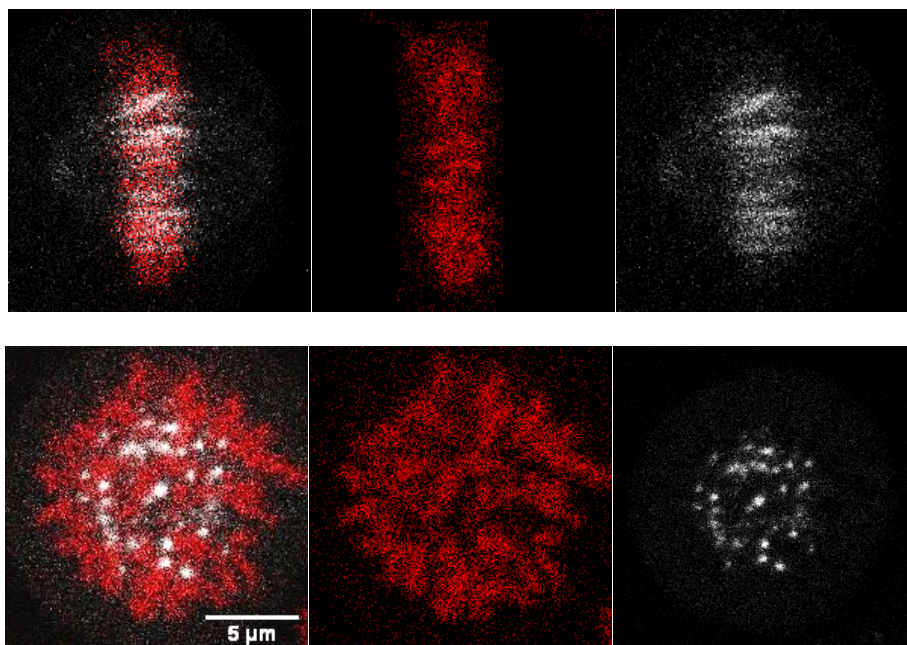
Slika 4.5. Mitotsko vreteno u ranoj prometafazi u vertikalnom položaju. SiR-DNA (crveno) i PRC1 GFP (bijelo). Prikazane tri različite stanice u istoj fazi. Skala je na svim slikama 5 µm.



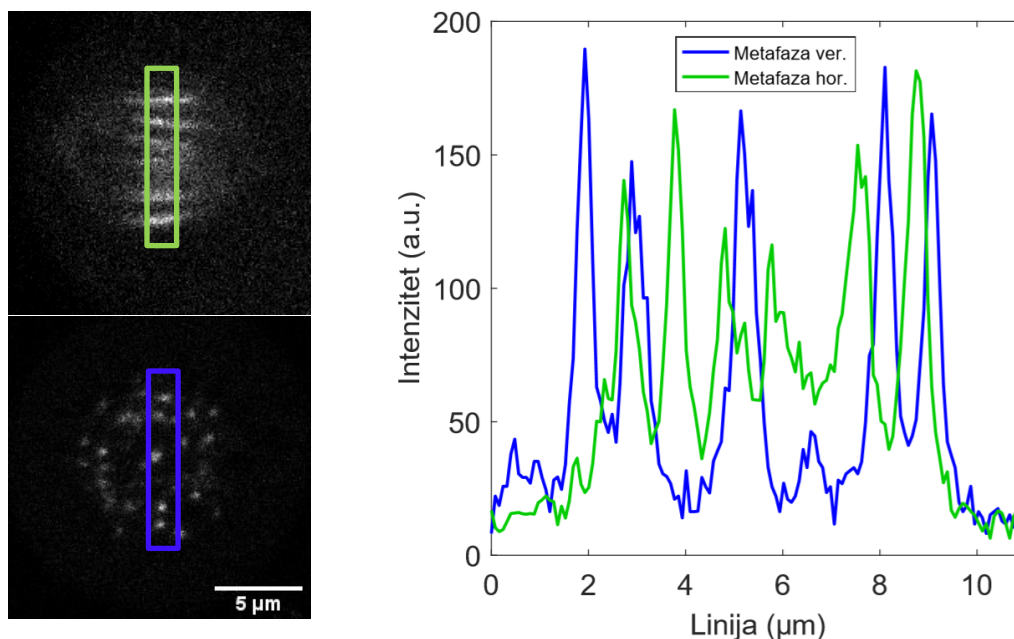
Slika 4.6. Profil intenziteta signala PRC1-GFP u svežnju i magličastoj formi u ranoj prometafazi u vertikalnom položaju. Skala je 5 µm. Profil je širok 12 piksela.

4.1.2. Lokalizacija u metafazi

Stanicu u metafazi bilo je moguće prepoznati u horizontalno položenom vretenu tako što se signal kromosoma nalazio u ravnoj liniji (slika 4.7). Signal PRC1 lokalizirao je u središtu vretena i gotovo odgovarao položaju kromosoma. Svežnjevi su bili dugački 4-5 μm , kako je ranije pokazano u literaturi.¹⁶ Vertikalni položaj vretena otkrio je da su kromosomi ravnomjerno raspoređeni u krug koji čini metafaznu ploču. Profil intenziteta pokazao je uske maksimume otprilike jednakih vrijednosti, neovisno je li vreteno položeno horizontalno ili vertikalno (slika 4.8). Vrijednost signala otprilike je jednaka kao i za svežanj u ranoj i kasnoj prometafazi, te se može pretpostaviti da se broj svežnjeva povećava od prometafaze do metafaze, no kojom brzinom i na koji način, dosada nije poznato.



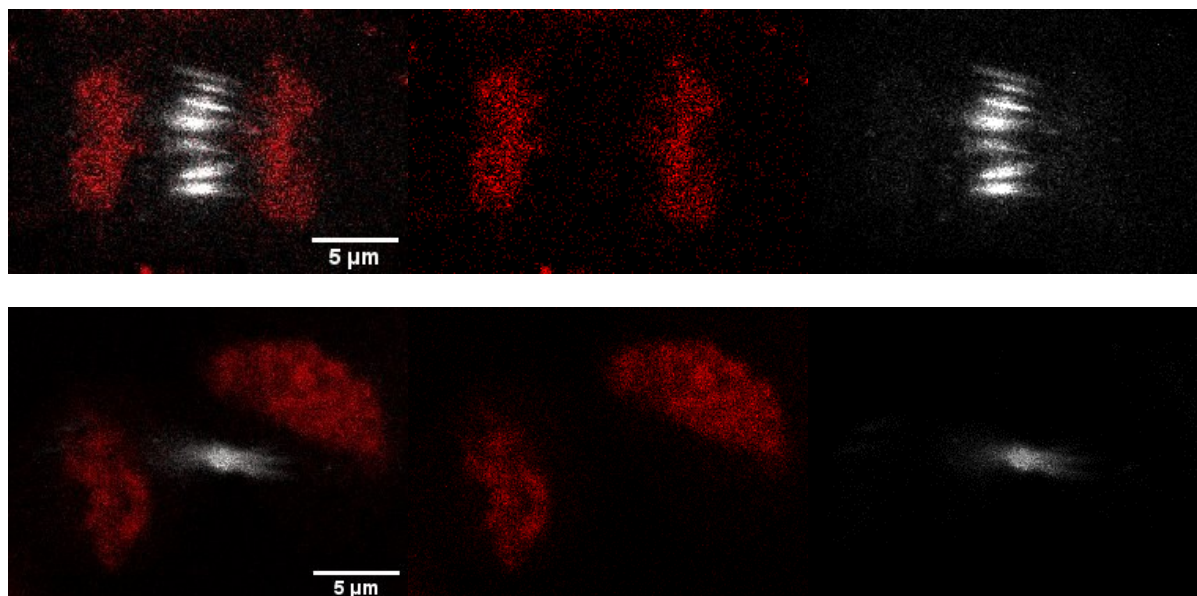
Slika 4.7. Mitotsko vreteno u metafazi u horizontalnom položaju (gore) i vertikalnom položaju (dolje). SiR-DNA (crveno) i PRC1 GFP (bijelo). Skala je na svim slikama 5 μm .



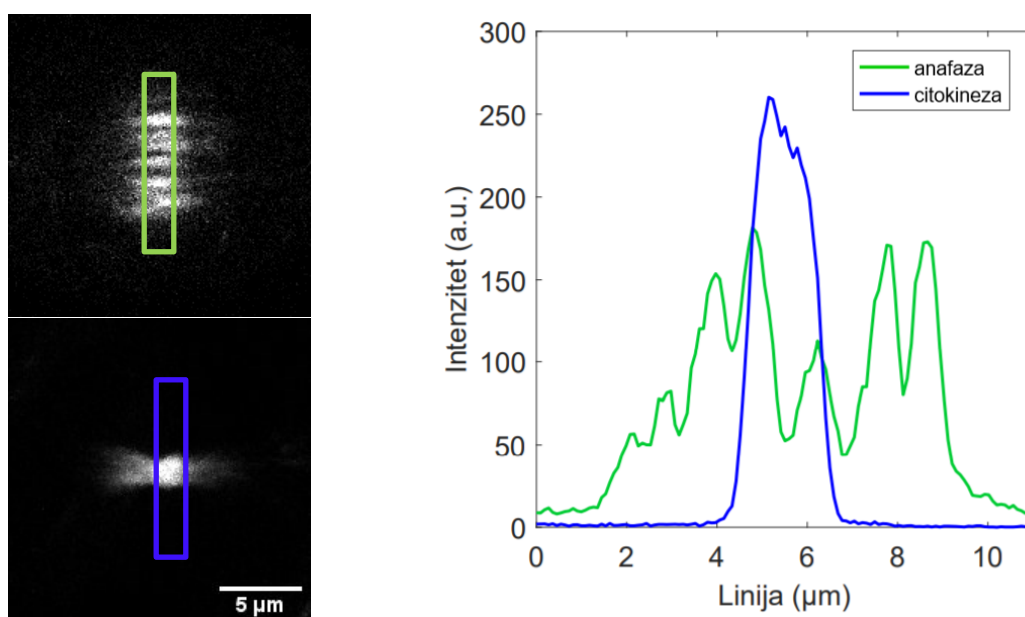
Slika 4.8. Usporedba profila intenziteta signala PRC1-GFP u metafazi u horizontalnom položaju (zeleno) i vertikalnom položaju (plavo). Skala je na svim slikama 5 µm. Profil je širok 12 piksela.

4.1.3. Lokalizacija u anafazi i telofazi

Nakon što je dođe do utišavanja mitotske kontrolne točke, SAC-a, kromosomi se u anafazi počinju odvajati u dvije nove stanice. Između njih su uočljivi antiparalelni mikrotubuli međusobno povezani proteinima poput PRC1. Anafazu je moguće uočiti na mikroskopu prema morfologiji vretena prikazanoj na slici 4.9. Sužavanjem središnje zone nastaje središnje tijelo, jasno prepoznatljivo prema jakom intenzitetu PRC1-GFP u središtu. Profil intenziteta pokazao je maksimume intenziteta signala PRC1-GFP koji odgovaraju položaju antiparalelnih svežnjeva (slika 4.10). U telofazi je uočljiv jedan, visoki, široki maksimum i pretpostavlja se da ta regija sadržava većinu PRC1 molekula u vretenu, te da su vezane čvrstim interakcijama. Budući da se već u anafazi počinje događati citokineza¹ i odvija se za vrijeme trajanja telofaze, a PRC1 je ključan za provedbu citokineze¹⁷⁻²⁰, posljednja proučavana faza mitoze u ovom radu naziva se telofaza/citokineza.



Slika 4.9. Završne faze mitoze. Mitotsko vreteno u anafazi (gore) i telofazi/citokinezi (dolje). SiR-DNA (crveno) i PRC1-GFP (bijelo). Skala je na svim slikama 5 μm.



Slika 4.10. Usporedba profila intenziteta signala PRC1-GFP u u anafazi (zeleno) i telofazi/citokinezi (plavo). Skala je na svim slikama 5 μm. Profil je širok 12 piksela.

4.1.4. Intenzitet signala PRC1 u citoplazmi i na vretenu kroz faze

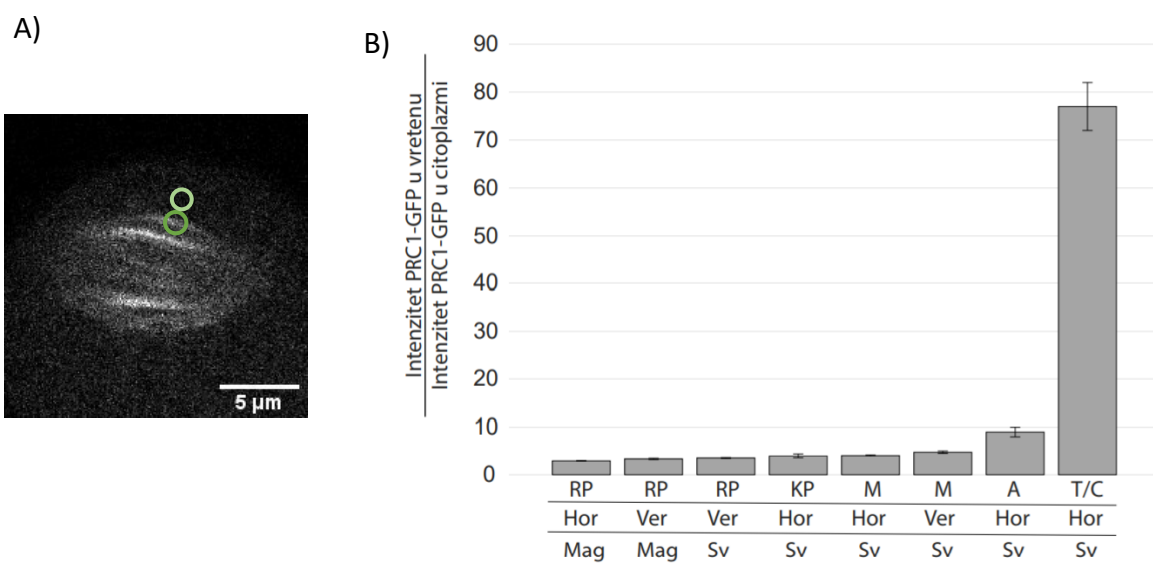
Da bi se provjerilo koliko je PRC1 vezano dugotrajnijim interakcijama na vretenu, a koliko je dostupno u citoplazmi kroz pojedine faze, uspoređeni su relativni signali PRC1-GFP. Uspoređen je intenzitet signala vretenu i citoplazmi odmah pokraj vretena. Budući da intenzitet GFP-a, u nekoj označenoj regiji odgovara efektivnoj koncentraciji proteina fuzioniranog na GFP, u nastavku rada intenzitet se koristi kao mjera za efektivnu koncentraciju. Statistička analiza podataka za intenzitet u različitim fazama (*t*-test za dva uzorka) pokazala je da je razlika u svim podacima koji odgovaraju prometafazi i metafazi nesignifikantna ($p > 0,1$), dok su razlike s anafazom ($p < 0,01$) i citokinezom ($p < 1 \times 10^{-5}$) bile signifikantne, jednako kao i razlike u podacima za anafazu i telofazu/citokinezu međusobno ($p = 0,001$).

Rezultati analize su dani kao omjeri intenziteta signala PRC1-GFP na vretenu i u citoplazmi u tablici 4.1. i grafički prikazani na slici 4.11. Intenzitet je mjereno u maloj regiji na vretenu i pokraj u citoplazmi. Neovisno o položaju vretena u odnosu na stakalce u ranoj prometafazi, koncentracija dostupnog PRC1-GFP otprilike je 3 puta veća na vretenu nego u citoplazmi. Taj omjer povećava se kako odmiču faze mitoze; u metafazi je približno 4 puta više PRC1-GFP na vretenu, u anafazi je (9 ± 2), a taj broj raste na (77 ± 10) kako se dioba približava kraju i nastaje centralno tijelo na koje se PRC1-GFP preferentno veže.

Tablica 4.1. Omjer intenziteta signala PRC1-GFP u vretenu i citoplazmi u različitim fazama diobe. Rezultati su dani kao (srednja vrijednost \pm SEM). Za svaku fazu analizirano je 10 stanica.

Faza	$\frac{\text{Intenzitet PRC_GFP na vretenu}}{\text{Intenzitet PRC1_GFP u citoplazmi}}$
Rana prometafaza hor.	$2,9 \pm 0,1$
Rana prometafaza ver.	$3,3 \pm 0,3$
Rana prometafaza (svežanj) ver.	$3,5 \pm 0,2$
Kasna prometafaza (svežanj) hor.	$4,0 \pm 0,9$
Metafaza hor.	$4,1 \pm 0,3$
Metafaza ver.	$4,8 \pm 0,5$
Anafaza	9 ± 2
Telofaza/citokineza	77 ± 10

Prema navedenim podacima jasno je da dolazi do postupnog vezanja PRC1-GFP na mikrotubule kako odmiču faze mitoze. Ipak, u ranoj prometafazi većina PRC1-GFP je vezana na samo vretenu. Je li riječ o slabijim interakcijama u odnosu na kasnije faze, teško je reći iz ovih podataka. Ovi podaci sugeriraju da postoji reakcijski gradijent kako odmiču faze mitoze, te se sve više PRC1-GFP veže na mikrotubule. Kako bi se saznalo koliko je zaista PRC1-GFP vezano na vretenu i kakav je relativni odnos tih interakcija kroz faze, u nastavku je proveden i analiziran FRAP eksperiment.

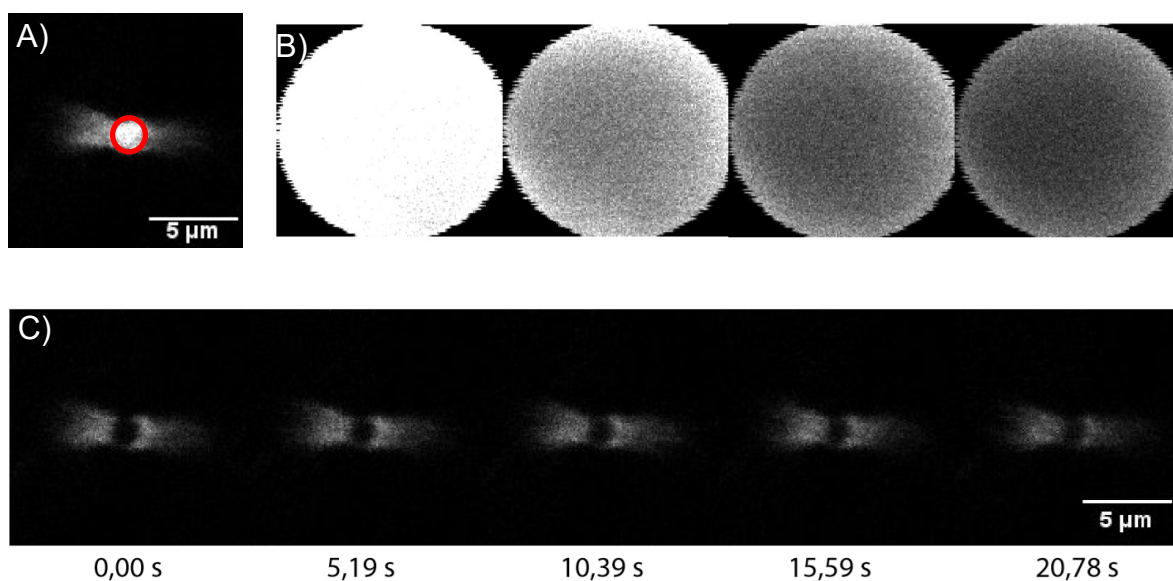


Slika 4.11. Intenzitet signala PRC1-GFP u različitim fazama mitoze. A) Način određivanja ROI na primjeru kasne prometafaze. B) Relativni odnos signala PRC1-GFP na vretenu i u citoplazmi. Oznake: RP-rana prometafaza, KP-kasna prometafaza, M-metafaza, A-anafaza, T/C-telofaza/citokineza, Hor-horizontalni položaj vretena, Ver-vertikalni položaj vretena, Mag-magličasta forma, Sv-svežanj mikrotubula.

4.2. Uspostava metode za mjerenje i analizu povratka intenziteta fluorescencije PRC1-GFP

4.2.1. Analiza FRAP krivulje za protein regulator citokineze 1, PRC1, optimirana je na podacima dobivenim u citokinezi

Nakon što je snimljena središnja ravnina u kanalima za vizualizaciju PRC1-GFP (488 nm) i SiR-DNA (640 nm), koje su prikazane u poglavlju ranije, na istim stanicama, proveden je FRAP eksperiment, uz vizualizaciju samo GFP-signala (488 nm). FRAP podrazumijeva primjenu laserskog snopa visokog intenziteta, koja će dovesti do fotoizbljeđenja u kratkim intervalima (engl. *bleach series*). Broj intervala je potrebno optimirati da ne dođe do trajnog fotooštećenja uslijed djelovanja lasera visokog intenziteta što je provjereno na način da je stanica vizualizirana nakon 10-15 minuta od primjene snopa visokog intenziteta. Neovisno o mjestu i trenutku fotoizbljeđenja stanice su nastavile stanični ciklus i došlo je do diobe. Broj ponavljanja snopa visokog intenziteta je 4, a interval je za sve serije 0,433 s. Snimljeno je 6 vremenskih okvira prije (engl. *prebleach series*) i 50-100 vremenskih okvira nakon izlaganja ROI laserskom snopu visokog intenziteta (engl. *postbleach series*). Slijed eksperimenta prikazan je na slici 4.12 za diobeno vreteno u telofazi/citokinezi.

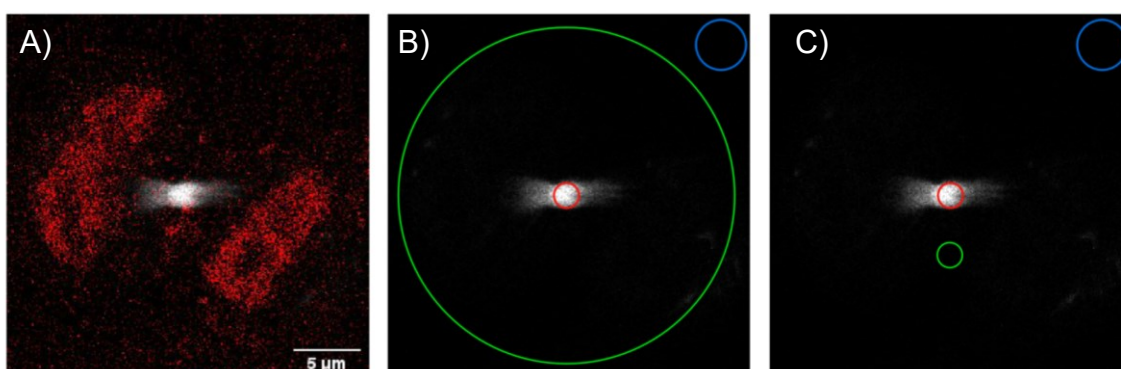


Slika 4.12. FRAP za PRC1-GFP u telofazi/citokinezi. A) Diobeno vreteno na početku snimanja u vremenu - 2,59 s. ROI je označen crvenim kružićem. B) ROI za vrijeme fotoizbljeđenja. Slika je uvećana 5 puta. C) Diobeno vreteno nakon fotoizbljeđenja.

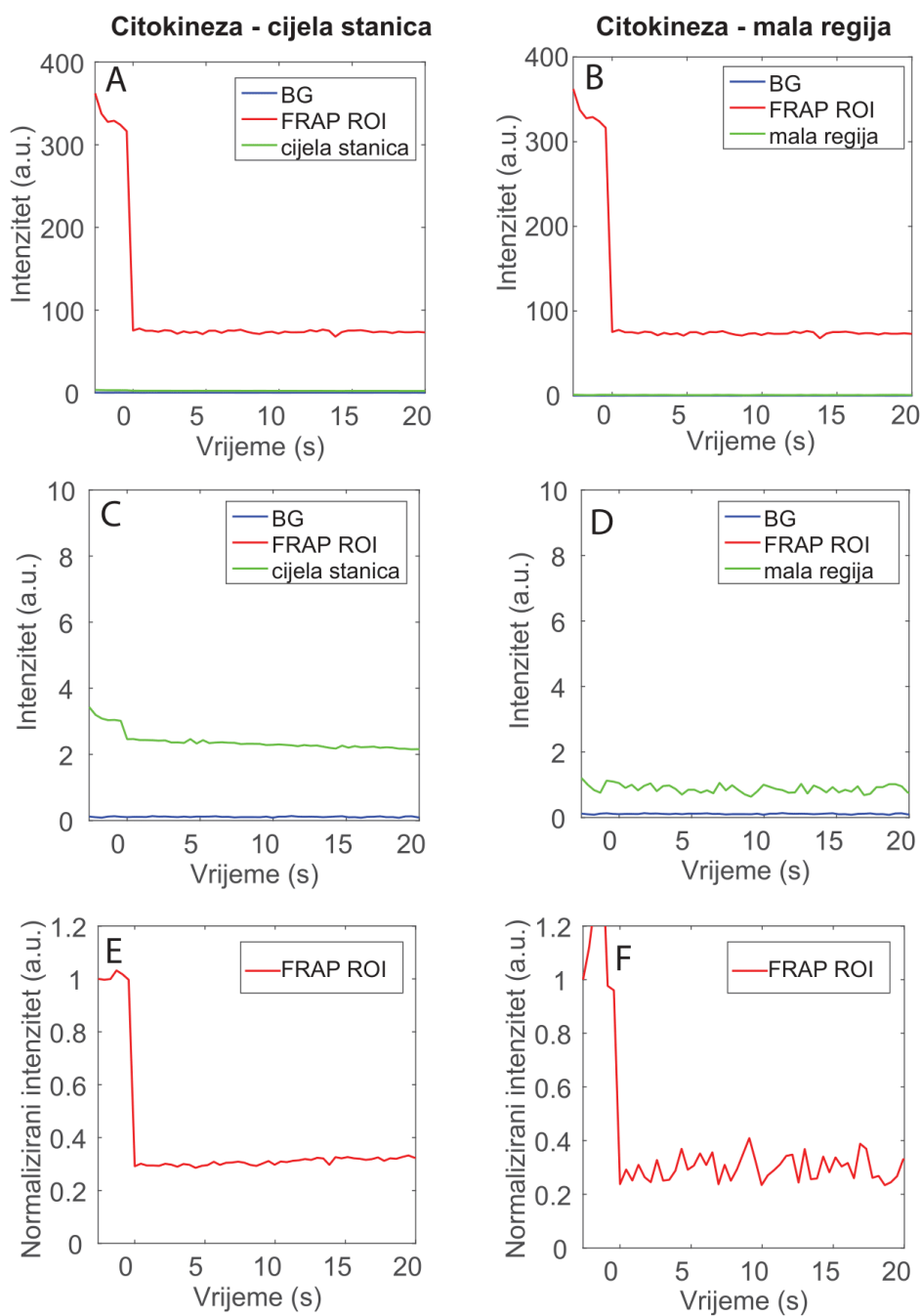
Na sekvenci nakon fotoizbljeđenja (4.12.C) moguće je opaziti da dolazi do fotoizbljeđenja i izvan ROI. Iz tog razloga potrebno je uvesti korekcije na fotoizbljeđenje cijele stanice. Protein od interesa,

PRC1, specifičan je *crosslinker* antiparalelnih mikrotubula u središnjem tijelu kojeg tvore mikrotubuli diobenog vretena u telofazi/citokinezi. Iz tog razloga optimizacija FRAP-a i analize podataka za FRAP krivulje provedena je na podacima dobivenim u telofazi/citokinezi. U svakoj stanici mjereno je intenzitet signala regije od interesa, ROI, pozadine, BG, te regije na koju će se korigirati fotoizbljeđenje normalizacijom vrijednosti signala za ROI. Fotoizbljeđenje se može korigirati na malu regiju unutar stanice, čiji signal ostaje konstantan za vrijeme snimanja, ili na cijelu stanicu koja i obuhvaća ROI. Načini korekcije i normalizacije su brojni, a u ovom radu se koristi način opisan u poglavlju 3.2.2., koji je također korišten i za FRAP drugih proteinskih struktura,⁴⁰ pa i samih mikrotubula.^{42,43}

Slika 4.13 prikazuje postupak mjerenja, a slika 4.14 dobivene krivulje u oba slučaja normalizacije. Intenzitet cijele stanice obuhvaća veliki dio citoplazme (zelena krivulja, slika 4.14.A) i iz tog razloga je približno nula, kao i intenzitet pozadine (plava krivulja). U telofazi/citokinezi nije tako očit signal citoplazme, kao i rub stanice kao u drugim fazama, gdje je bilo lakše označiti regiju za mjerenje. Budući da je PRC1-GFP općenito prisutan u maloj količini u citoplazmi, i mjerenje male regije u citoplazmi pokazuje sličan trend (4.14.B). Ipak, kad se uveća dio koji prikazuje krivulje pozadine (plavo) i regije za korekciju (zeleno), jasno je da se krivulja dobivena za cijelu stanicu (slika 4.14.C) ponaša znatno drugačije, primjetan je gotovo eksponencijalni pad signala u vremenu prije $t = 0$ s, što je očit pokazatelj fotoizbljeđenja. Nakon toga krivulja pokazuje manje oscilacije u odnosu na krivulju na slici 4.14.D. Iako se ta razlika ne čini značajna, prilikom normalizacije, FRAP krivulja za ROI ponaša se znatno drugačije (slike 4.14. E i F), s velikim oscilacijama koje nisu vidljive u originalnoj krivulji. Time je jasno pokazano da normalizacija koja uključuje malu, referentnu regiju uvodi značajan šum u podatke nakon $t = 0$ s, te nije pogodna za korištenje. U daljnjem radu koristi se normalizacija na signal cijele stanice u prvom vremenskom okviru snimanja ($t = -2,59$ s).



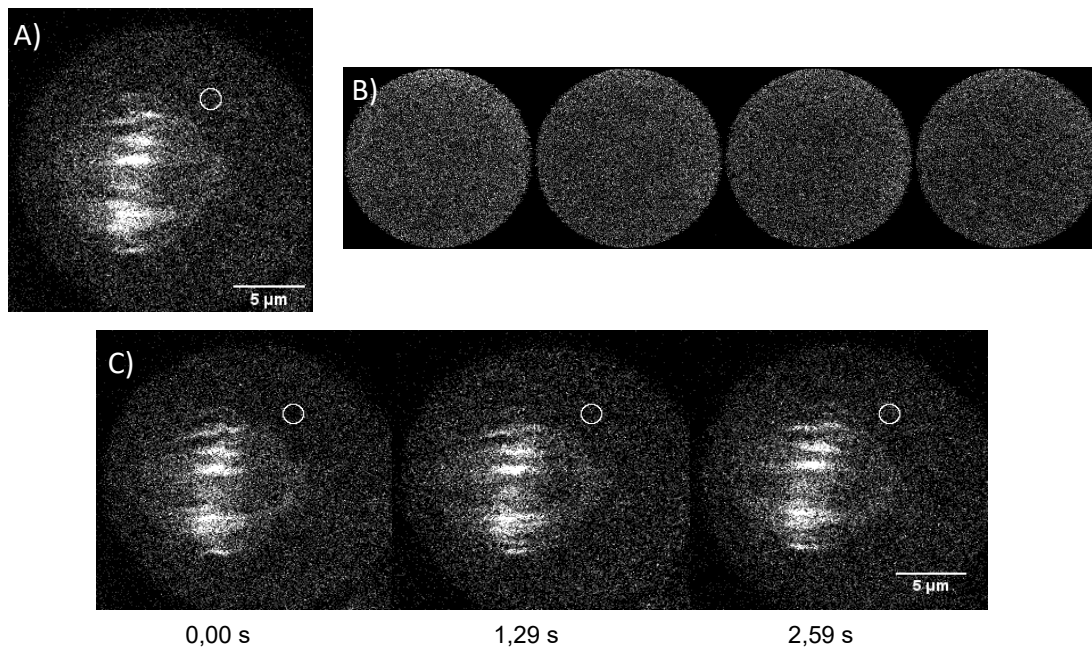
Slika 4.13. Analiza FRAP-a za PRC1-GFP. A) Diobeno vreteno u telofazi/citokinezi. SiR-DNA (crveno) i PRC1-GFP (bijelo). B) Normalizacija na signal cijele stanice. C) Normalizacija na malu regiju. ROI (crveno), regija za normalizaciju (zeleno), BG (plavo).



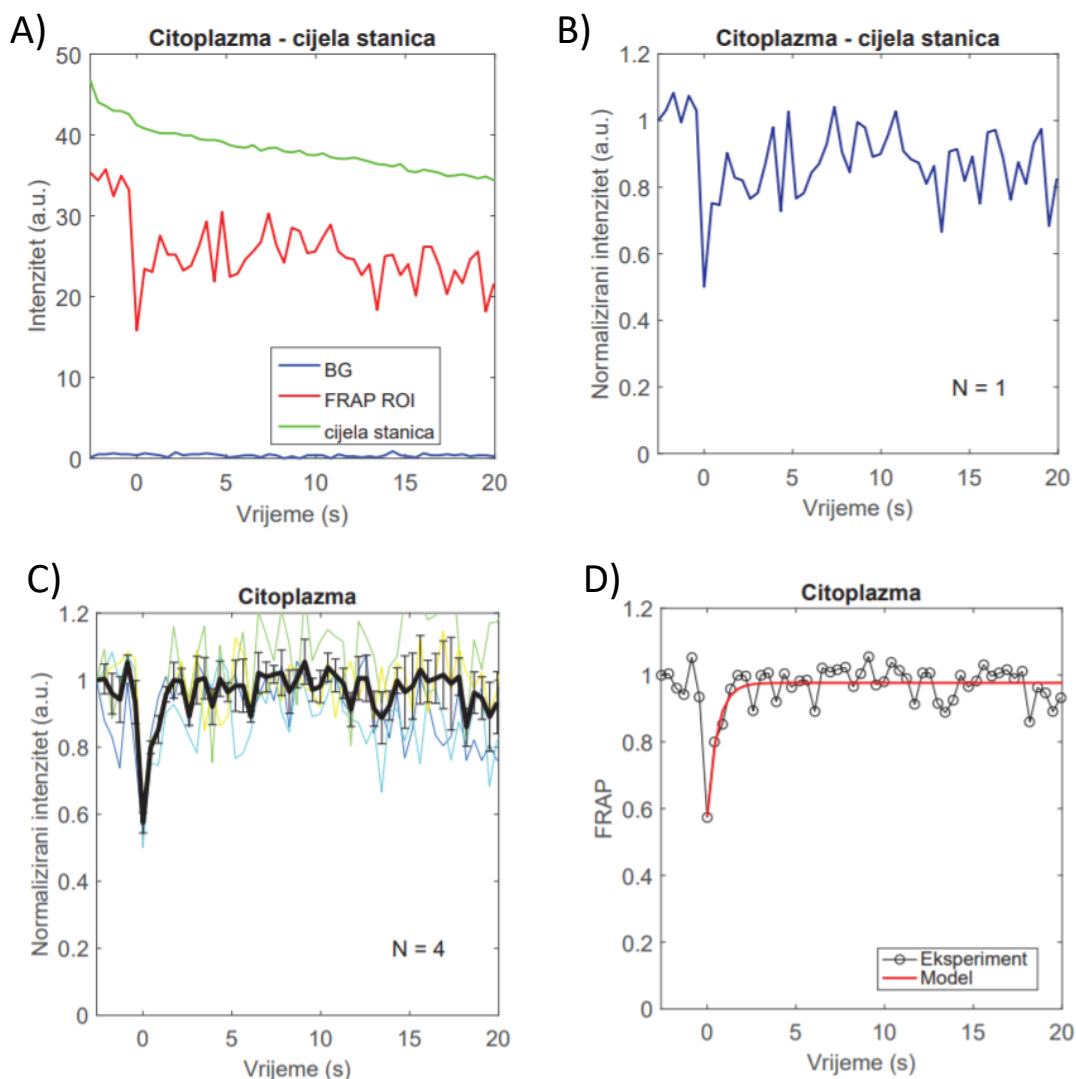
Slika 4.14. Analiza FRAP-a za PRC1-GFP. A, C i E) Normalizacija na signal cijele stanice. B, D i F) Normalizacija na malu regiju. ROI (crveno), regija za normalizaciju (zeleno), BG (plavo).

4.2.2. FRAP PRC1-GFP u citoplazmi

Da bi se FRAP koristio kao metoda za proučavanje biofizičkih svojstava proteina fuzioniranog na GFP, nužno je provjeriti kakav trend će imati krivulja za FRAP frakcije slobodnog proteina u mediju. U tu svrhu, napravljen je FRAP u citoplazmi stanice u diobi. Budući da je frakcija PRC1-GFP u citoplazmi malena u odnosu na vreteno, a izrazito mobilna, teško je na oko uočiti promjenu (slika 4.15). Međutim, kad se ROI analizira, moguće je dobiti FRAP krivulju. Na slici 4.16.A prikazane su krivulje koje odgovaraju intenzitetu signala pozadine, cijele stanice i ROI gdje je izveden FRAP za stanicu na slici 4.15. Iako na prvi pogled ne dolazi do potpunog oporavka fluorescencije kakav bi se očekivao za slobodni protein, nakon korekcije i normalizacije opisane u poglavlju 3.2.2. (slika 4.16.B) krivulja se približava u desnom dijelu vrijednosti 1. Za valjanu analizu potrebno je eksperiment ponoviti više puta i uprosječiti više normaliziranih krivulja. Tako dobivena krivulja prikazana je na slici 4.16.C. Parametri FRAP-a dobiveni su metodom nelinearne regresije prilagođavanjem modela za kojeg vrijedi $FRAP(t) = F_0 + A(1 - e^{-bt})$, Parametri i statističke mjere za evaluaciju kvalitete slaganja modela i eksperimentalnih podataka dane su u tablici 4.1, a krivulja dobivena korištenjem kinetičkog modela prikazana je na slici 4.16.D. Mjere kvalitete slaganja eksperimentalnih podataka i teorijskih izračuna pokazuju da dobivena krivulja može opisati eksperimentalne podatke, ali je zasigurno potrebno više mjerenja da bi se smanjio šum podataka.



Slika 4.15. FRAP za PRC1-GFP u citoplazmi. A) Diobeno vreteno na početku snimanja u vremenu -2,59 s. ROI je označen bijelim kružićem. B) ROI za vrijeme fotoizbljeđenja. Slika je uvećana 7 puta. C) Diobeno vreteno nakon fotoizbljeđenja.



Slika 4.16. Analiza FRAP-a za PRC1-GFP u citoplazmi. A) Intenziteti signala u stanici bez korekcije i normalizacije. B) Intenzitet signala ROI u citoplazmi nakon korekcije i normalizacije. C) FRAP krivulja za PRC1-GFP u citoplazmi dobivena kao prosjek 4 mjerenja. D) Model za FRAP-PRC1-GFP u citoplazmi.

Tablica 4.1. Parametri modela i statistička evaluacija za FRAP u citoplazmi. F_0 , A i b su dani kao (koeficijent \pm interval pouzdanosti od 95%).

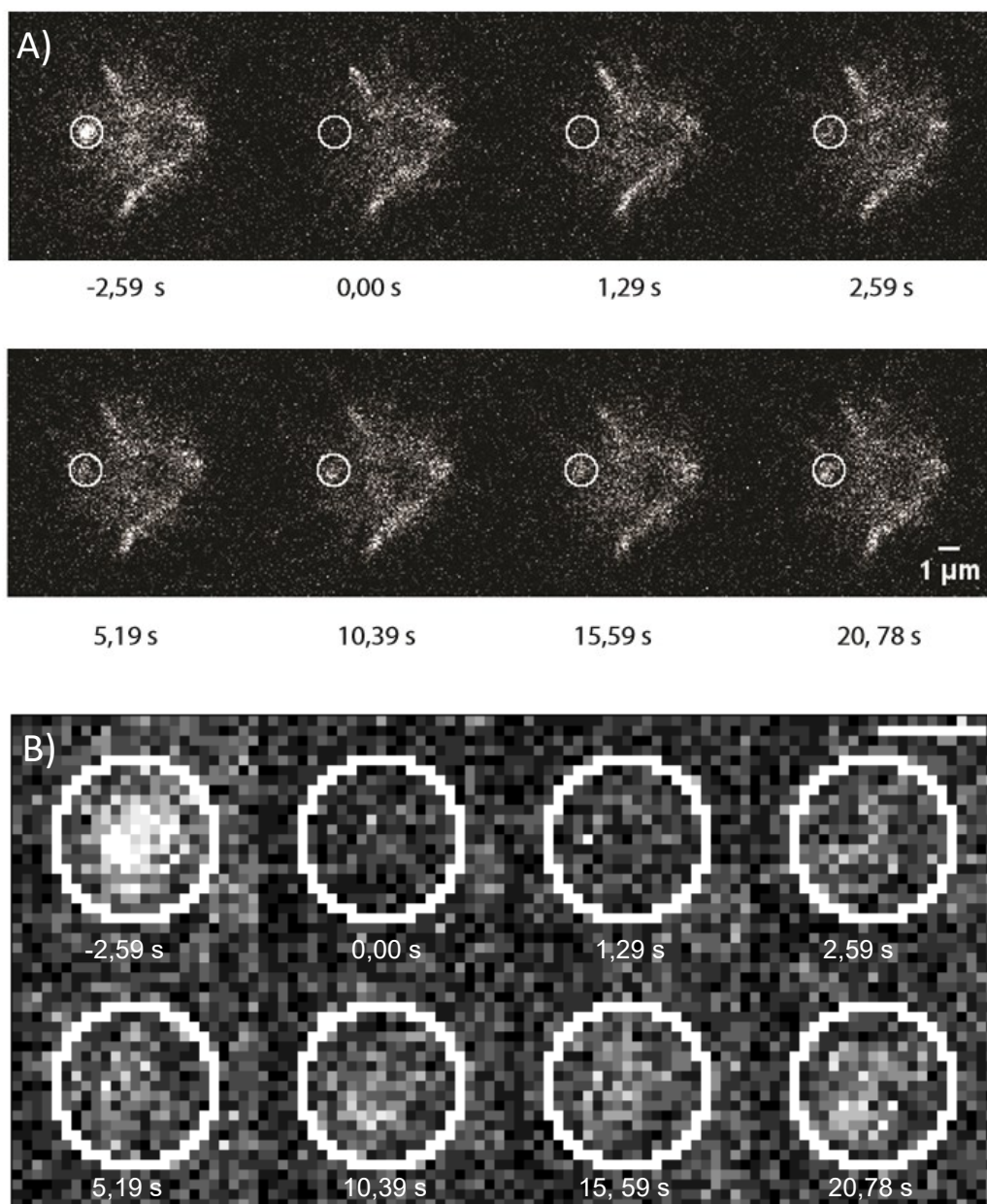
Parametri	Citoplazma
F_0	$0,57 \pm 0,04$
A	$0,4 \pm 0,1$
b / s^{-1}	$1,8 \pm 0,7$
$F_\infty (F_0 + A)$	$1,0 \pm 0,1$
SSE	0,09
R^2	0,67
modificirani R^2	0,98
RMSE	0,05

Budući da je povratak fluorescencije nakon fotoizbljeđenja u citoplazmi za PRC1-GFP izračunat prema formuli (1) (100 ± 13) %, te da je vrijeme polureakcije FRAP-a iznimno kratko i iznosi ($0,4 \pm 0,5$) s, može se zaključiti da je PRC1-GFP izrazito mobilan u citoplazmi. Vrlo je vjerojatno da je riječ o slobodnom proteinu koji nije vezan za drugi protein već podliježe difuziji. U prilog tome ide i što se vrijeme polureakcije za sami GFP u citoplazmi na kojeg nije fuzioniran protein također u literaturi iznosi manje od sekunde.^{34,45} Treba svakako uzeti u obzir razlike u molarnoj masi, sam GFP je mali protein od 26.9 kDa,¹⁷ a PRC1 je protein srednje veličine od 70 kDa²⁰. Budući da vrijeme polureakcije nije usporedivo između različitih radova i iznimno ovisi o veličini ROI i veličini molekule, za pravu usporedbu potrebno je izračunati koeficijent difuzije. No, činjenica da je dobiven sličan red veličine, sugerira da je rezultat zadovoljavajući. PRC1-GFP analizom FRAP krivulje je iznimno mobilan u stanici kada nije vezan na vreteno, a kada je čvrsto vezan na diobeno vreteno i sudjeluje u izgradnji središnjeg tijela u telofazi/citokinezi, jako je mali povratak fluorescencije. Time je pokazano da je FRAP zadovoljavajuća metoda za proučavanje mobilnosti PRC1-GFP i da se tom metodom može proučavati biofizička svojstva PRC1-GFP u različitim fazama mitoze.

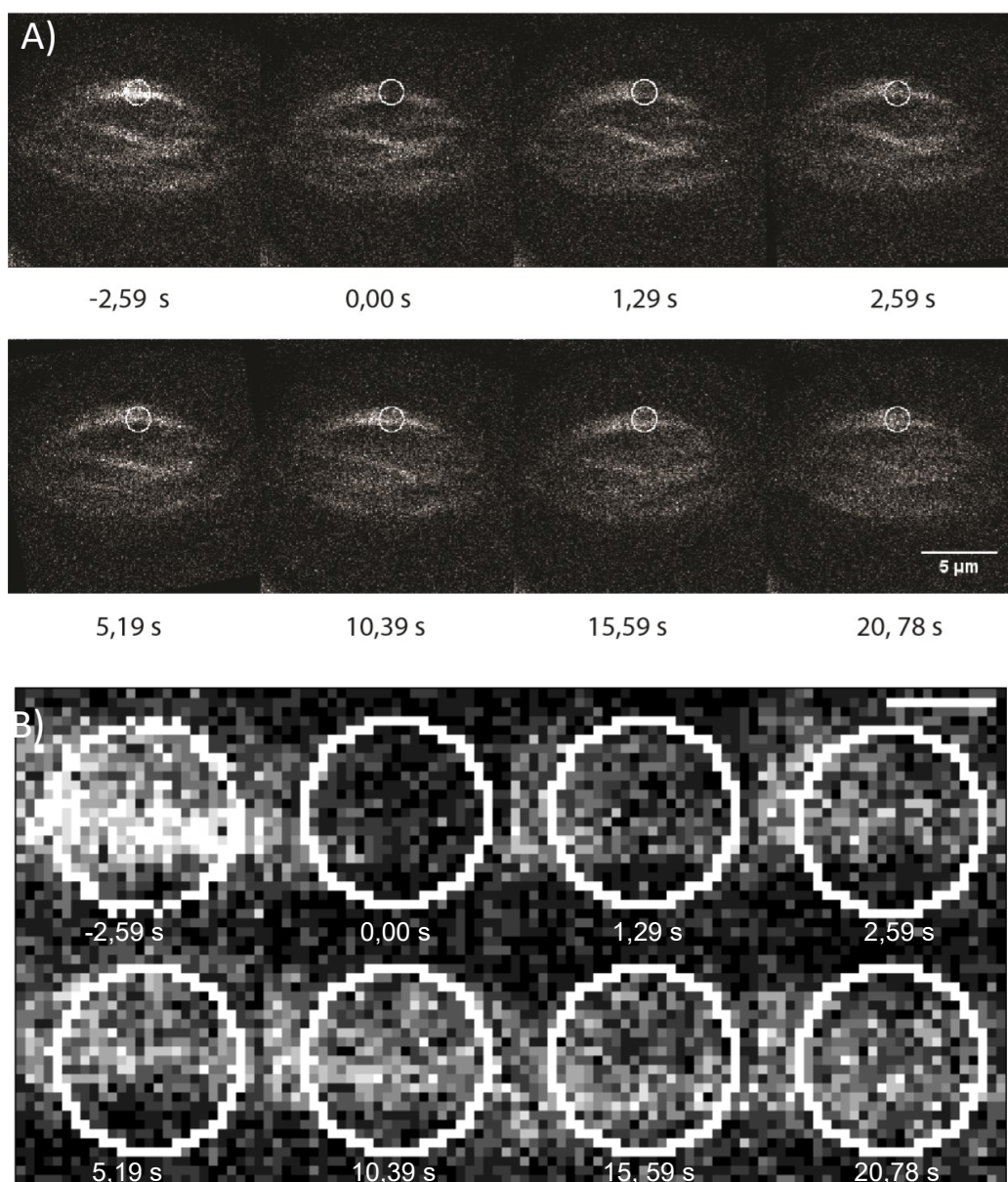
4.3. Mjerenje i analiza povratka intenziteta fluorescencije PRC1-GFP u svim fazama mitoze nakon fotoizbljeđenja (FRAP PRC1-GFP)

4.3.1. FRAP PRC1-GFP u svežnju u ranoj i kasnoj prometafazi

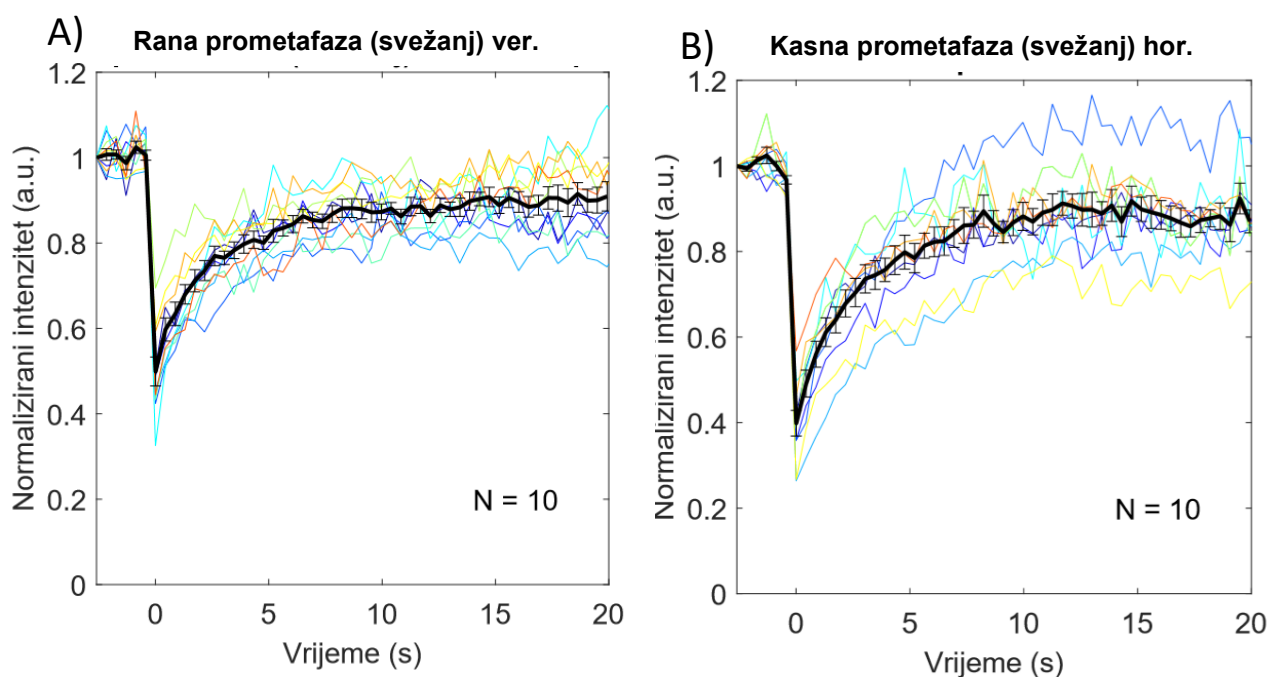
Ranije je prikazano da se za vrijeme trajanja prometafaze, od puknuća jezgrine ovojnice do nastanka metafazne ploče, postupno se formiraju svežnjevi mikrotubula. PRC1-GFP je u toj fazi fosforiliran na Thr-470 i Thr-481, te je time spriječena njegova dimerizacija. Također, dio PRC1 može lokalizirati i na K-vlaknima¹⁸, no svakako postoji veliki afinitet vezanja na vreteno jer rezultati u prethodnom poglavlju pokazuju da PRC1-GFP dominantno lokalizira na vretenu. Jedan ili dva svežnja mikrotubula obilježenih s PRC1-GFP formiraju se već u ranoj fazi, dok su kromosomi složeni u obliku rozete. Kako bi se ispitala biofizikalna svojstva takvih svežnjeva, te usporedila sa svojstvima u kasnijim fazama, napravljen je FRAP eksperiment u trenutku kada vreteno ima formiran jedan ili dva svežnja, što je vidljivo u vretenu u vertikalnom položaju (slika 4.17), te kad ima više svežnjeva u kasnijoj prometafazi (slika 4.18). Eksperiment je ponovljen u 10 različitih stanica te je izračunata srednja vrijednost i standardna pogreška u svakoj vremenskoj točki na normaliziranim podacima. Povratak fluorescencije u ROI nakon fotoizbljeđenja (slika 4.19) usporediv je za obje situacije.



Slika 4.17. FRAP za PRC1-GFP u svežnju u ranoj prometafazi u vertikalnom položaju. A) Diobeno vreteno s ROI (bijeli krug). B) Uvećana ROI sa slike A. Skala je 1 μm .



Slika 4.18. FRAP za PRC1-GFP u svežnju u kasnoj prometafazi u horizontalnom položaju. A) Diobeno vreteno s ROI (bijeli krug). **B)** Uvećana ROI sa slike A. Skala je 1 µm. Diobeno vreteno na početku snimanja u vremenu -2,60 s, te nakon fotoizbljedenja (0,00 – 20,78 s).



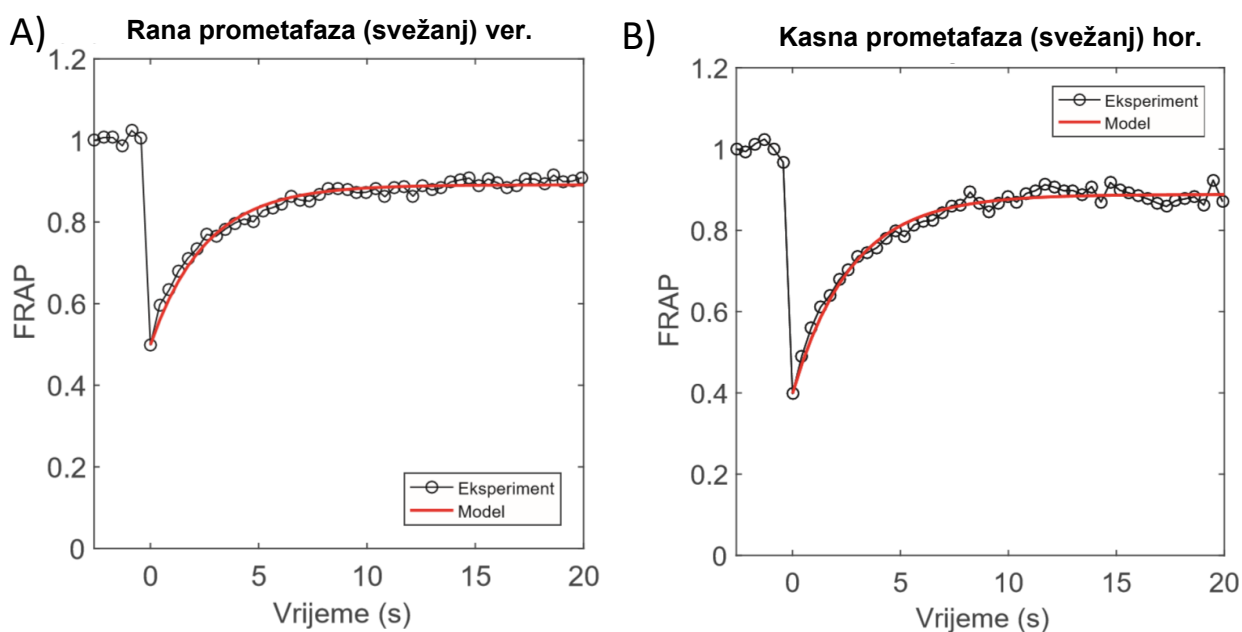
Slika 4.19. FRAP krivulja za PRC1-GFP u svežnju u prometafazi. A) Rana prometafaza u vertikalnom položaju. B) Kasna prometafaza u horizontalnom položaju. Prikazana je srednja vrijednost i standardna pogreška u svakoj vremenskoj točki (crno).

Da bi se FRAP krivulja mogla ispravno tumačiti, potrebno je izračunati metodom nelinearne regresije parametre koji će dati najbolje slaganje eksperimentalne krivulje i modela, a parametri za evaluaciju kvalitete slaganja modela i eksperimentalnih podataka dani su u tablici 4.2. Krivulja dobivena korištenjem kinetičkog modela prikazana je na slici 4.20. Mjere kvalitete slaganja eksperimentalnih podataka i teorijskih izračuna pokazuju da dobivena krivulja vjerodostojno opisuje eksperimentalne podatke.

Primjenom modela na eksperimentalne podatke za svežanj mikrotubula u ranoj prometafazi, dobiveno je prema jednadžbama (1) i (2) da je (78 ± 2) % proteina PRC1-GFP mobilno, a tek mala frakcija je vezana čvrsto na mikrotubule (slika 4.35). U kasnoj prometafazi u jednom svežnju (81 ± 2) % proteina je mobilno, dok je tek mala frakcija čvrsto vezana na vreteno. Oba modela odgovaraju eksperimentalnim podacima, što je jasno iz tablice 4.2., a dobivene vrijednosti su slične. Time je pokazano da je svežanj u prometafazi moguće karakterizirati prema vezanoj frakciji PRC1-GFP od ~ 20 %. Vrijeme polureakcije FRAP-a, u ovom slučaju predstavlja vrijeme povratka pola moguće mobilne frakcije na mikrotubule, te izračunato iz parametra b . Dobivene vrijednosti su i $(1,8 \pm 0,3)$ s za svežanj u ranoj prometafazi i $(1,89 \pm 0,3)$ s za svežanj u kasnoj prometafazi.

Tablica 4.2. Parametri modela i statistička evaluacija za FRAP u svežnju u prometafazi. F_0 , A i b su dani kao (koeficijent \pm interval pouzdanosti od 95%).

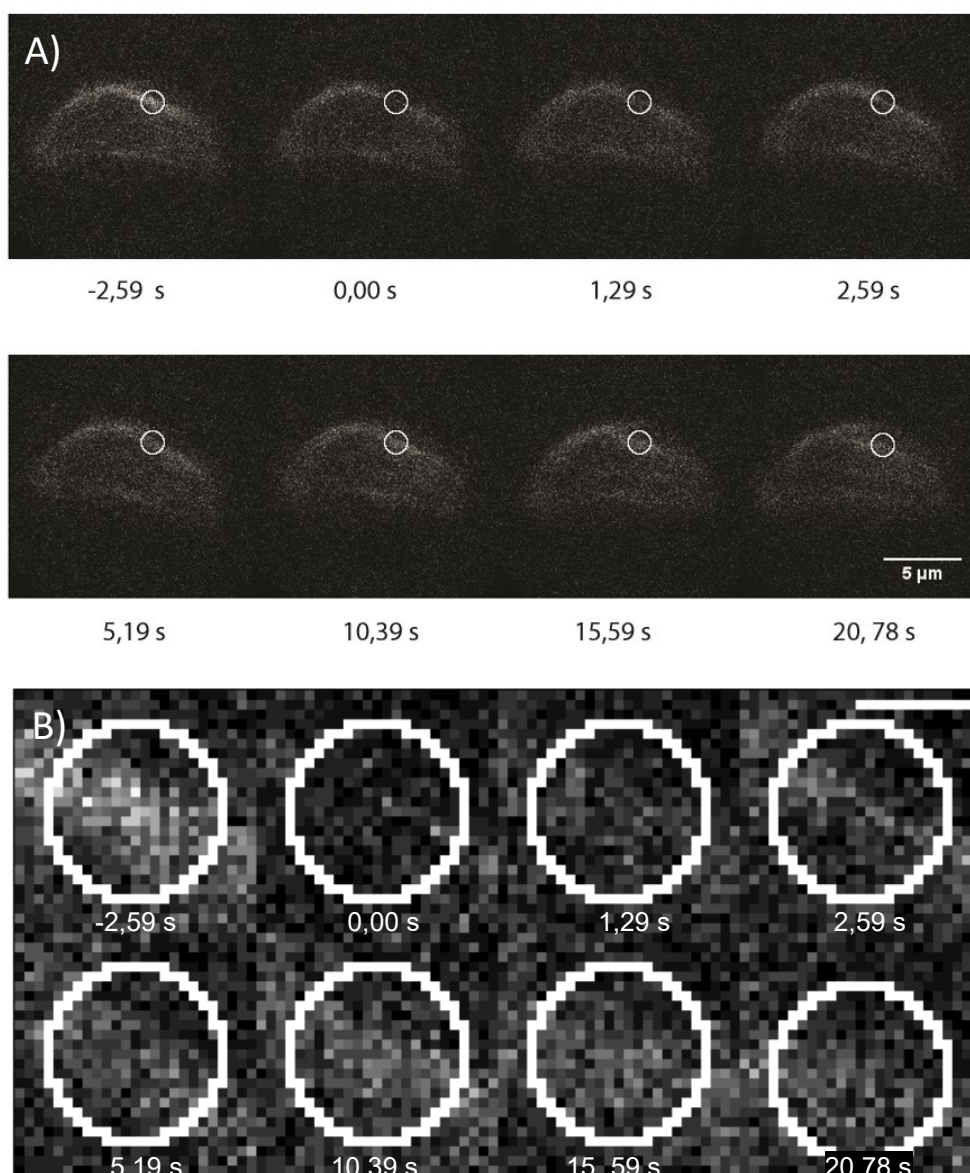
Parametri	Rana prometafaza (svežanj) – ver.	Kasna prometafaza (svežanj) – hor.
F_0	$0,50 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,02$
A	$0,392 \pm 0,006$	$0,490 \pm 0,007$
b / s^{-1}	$0,39 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,03$
$F_\infty (F_0 + A)$	$0,89 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$
SSE	0,009	0,01
R^2	0,98	0,98
modificirani R^2	0,98	0,98
RMSE	0,01	0,02



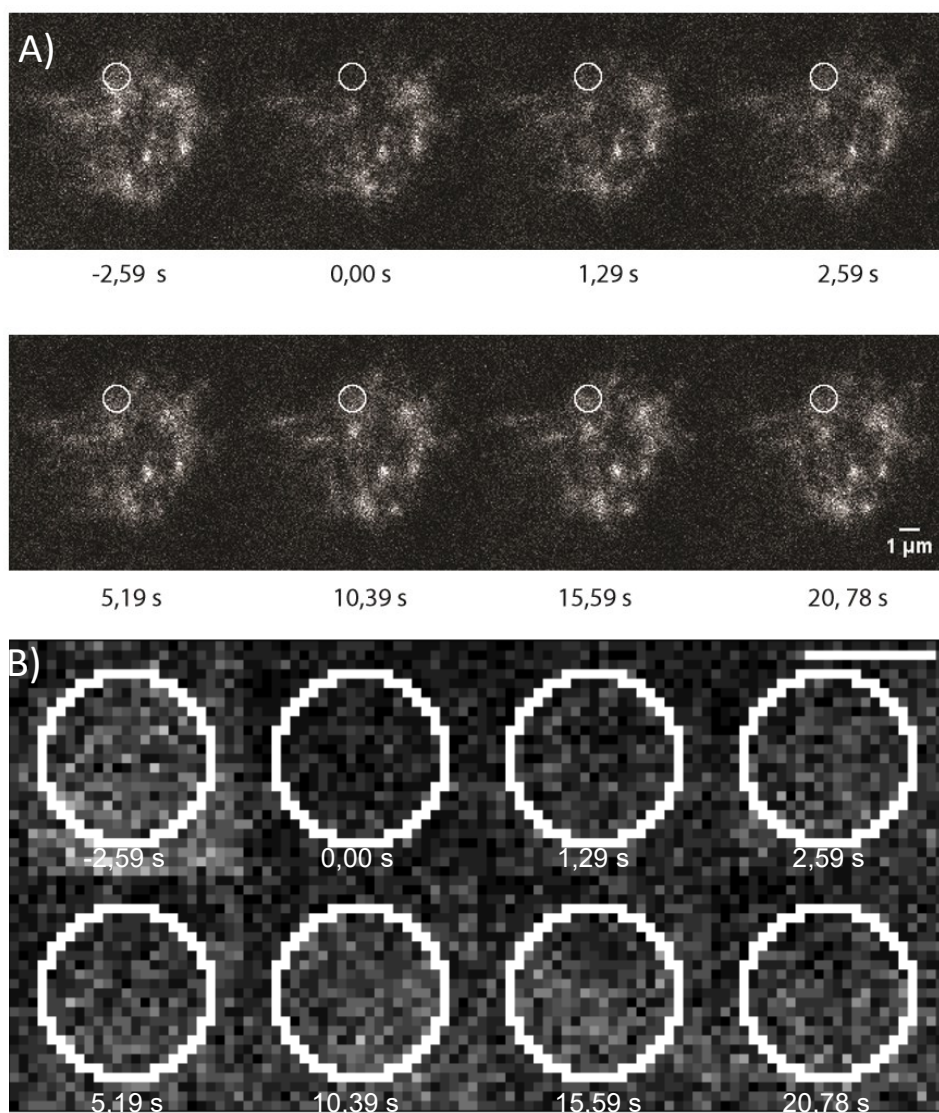
Slika 4.20. Model za FRAP PRC1-GFP u svežnju u prometafazi. A) Rana prometafaza u vertikalnom položaju. B) Kasna prometafaza u horizontalnom položaju.

4.3.2. FRAP-PRC1-GFP u magličastoj formi u ranoj prometafazi

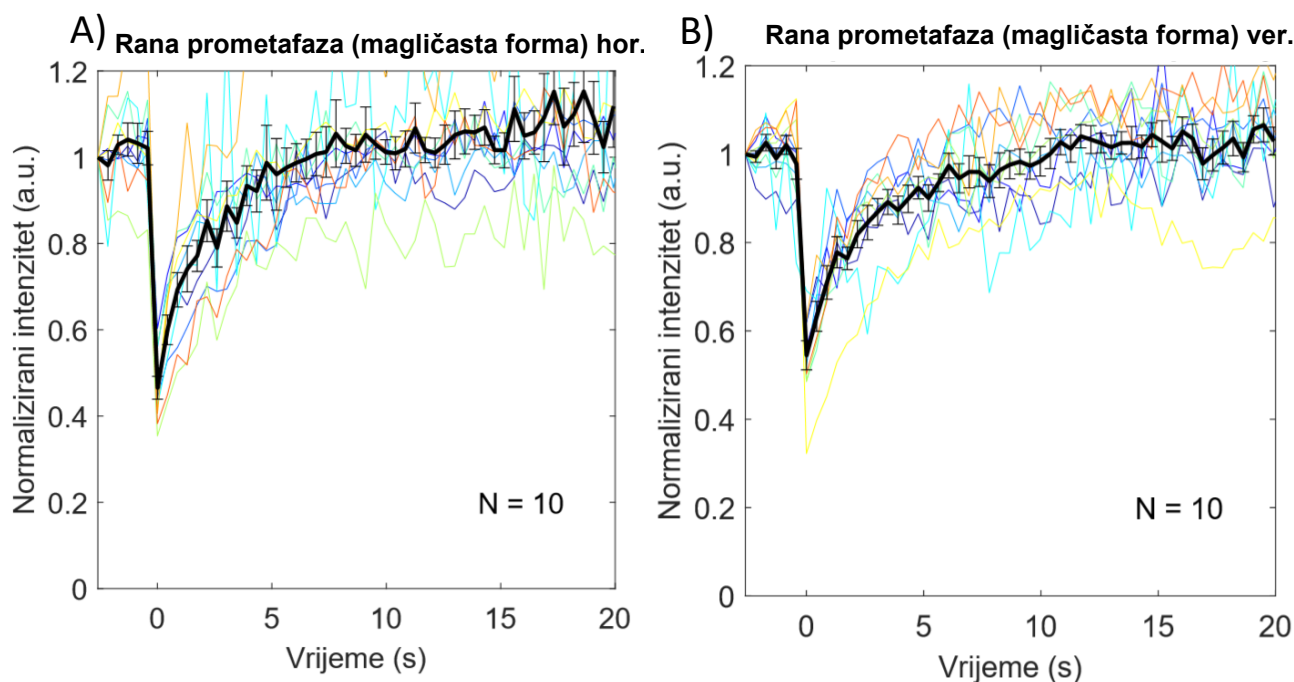
Osim formiranih svežnjeva, značajnu površinu u presjeku vretena u ranoj prometafazi zauzima magličasta struktura unutar koje nema jasno separiranih svežnjeva. Takva struktura dominirala je u ranijim fazama prometafaze, koje je moguće uočiti u vretenu prema položaju kinetohora u obliku rozete na obodu vretena. Upravo takve strukture u horizontalnom (slika 4.21) i vertikalnom položaju (slika 4.22) bile su u fokusu ovog istraživanja. FRAP krivulje za 10 različitih stanica, kao i prosječna krivulja prikazane su na slici 4.23.



Slika 4.21. FRAP za PRC1-GFP u magličastoj formi u ranoj prometafazi u horizontalnom položaju. A) Diobeno vreteno s ROI (bijeli krug). B) Uvećana ROI sa slike A. Skala je 1 µm.



Slika 4.22. FRAP za PRC1-GFP u magličastoj formi u ranoj prometafazi u vertikalnom položaju. A) Diobeno vreteno na početku snimanja u vremenu -2,60 s, te nakon fotoizbljeđenja (0,00 – 20,78 s). ROI je označena bijelim krugom. B) Uvećana ROI sa slike A. Skala je 1 μm.

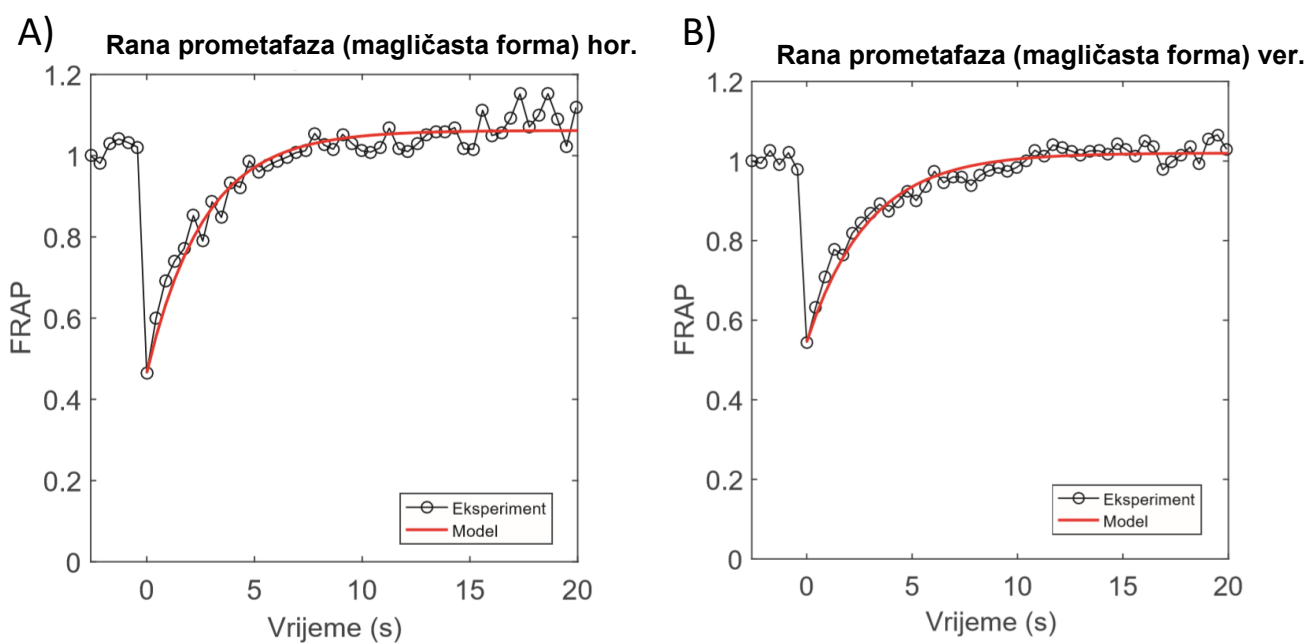


Slika 4.23. FRAP krivulja za PRC1-GFP u magličastoj formi u ranoj prometafazi. A) Rana prometafaza u horizontalnom položaju. B) Rana prometafaza u vertikalnom položaju. Prikazana je srednja vrijednost i standardna pogreška u svakoj vremenskoj točki (crno).

Iako se iz slike 4.18 možda ne čini da dolazi do potpunog oporavka koji sugerira maksimalnu mobilnost molekula u stanici, eksperimentalna krivulja pokazuje da je F_{∞} postigao vrijednost F_i , tj. da je udio mobilne faze gotovo 100 %. Za potvrdu opservacije, kinetički model je prilagođen na eksperimentalne podatke (poglavlja 2.3.3. i 3.2.3.) metodom nelinearne regresije najmanjeg kvadrata (tablica 4.3 i slika 4.24). Time je dobiveno da su sve molekule PRC1-GFP koje se nalaze na vretenu, neovisno o položaju u odnosu na stakalce, u ranoj prometafazi mobilne i da mobilna frakcija iznosi točnije $(110 \pm 10) \%$ u horizontalno položenom vretenu i $(100 \pm 10) \%$ u vertikalno položenom vretenu. Postotak veći od 100 nije iznenađujući jer je riječ je o fazi u kojoj se događaju brojne promjene na razini vretena te krivulja u desnom dijelu grafa više oscilira nego u drugim fazama, što utječe i na kvalitetu slaganja modela i eksperimenta. Time se može objasniti i povratak mobilne frakcije na više od 1, što se primjećuje u desnom dijelu grafa. Vrijeme polureakcije FRAP-a usporedivo je s onim za svežanj u prometafazi i iznosi $(1,8 \pm 0,3)$ s za horizontalni položaj, odnosno $(2,0 \pm 0,4)$ s za vertikalni položaj. PRC1-GFP vezan na vreteno jednako je mobilan kao i u citoplazmi, no vrijeme polureakcije je veće, što pokazuje da nije riječ o potpuno difuznom proteinu u ranoj prometafazi, već i tada postoji interakcija s mikrotubulima.

Tablica 4.3. Parametri modela i statistička evaluacija za FRAP u ranoj prometafazi. F_0 , A i b su dani kao (koeficijent \pm interval pouzdanosti od 95%).

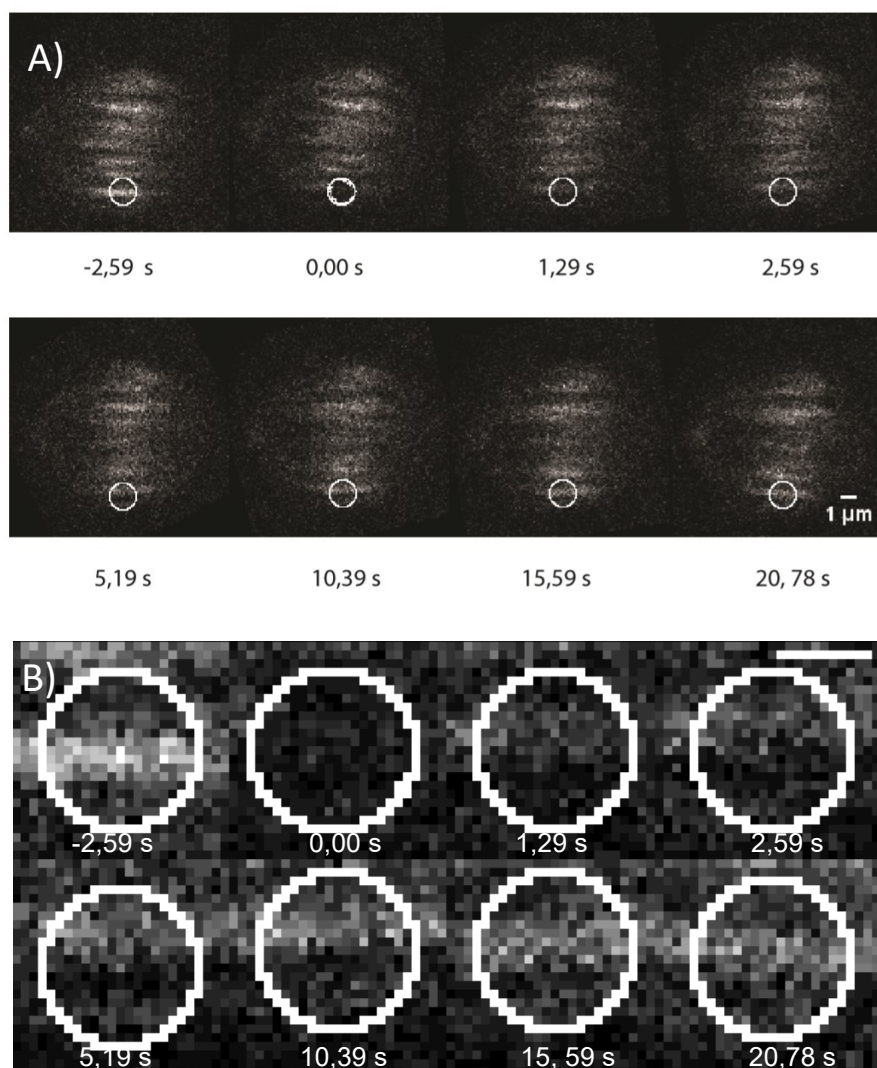
Parametri	Rana prometafaza (magličasta forma) hor.	Rana prometafaza (magličasta forma) ver.
F_0	$0,47 \pm 0,09$	$0,5 \pm 0,1$
A	$0,60 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,01$
b / s^{-1}	$0,38 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,04$
$F_\infty (F_0 + A)$	$1,06 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,1$
SSE	0,06	0,03
R^2	0,93	0,95
<i>modificirani</i> R^2	0,93	0,95
RMSE	0,04	0,02



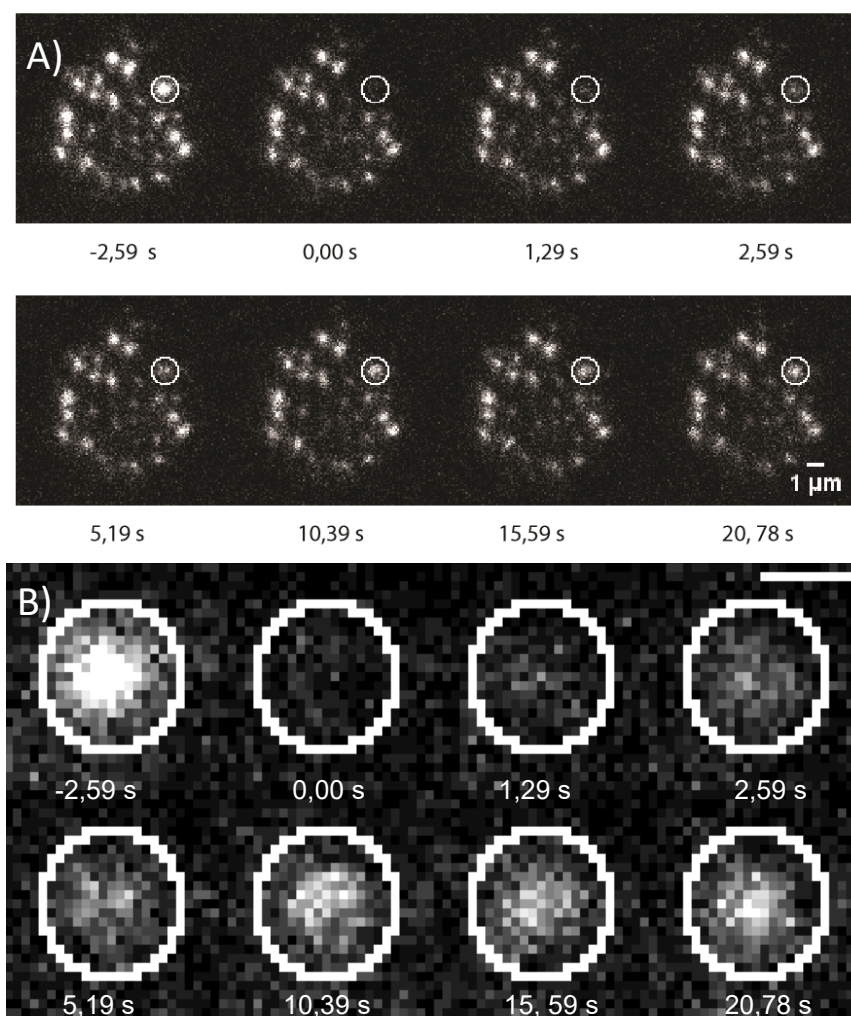
Slika 4.24. Model za FRAP PRC1-GFP u magličastoj formi u prometafazi. A) Rana prometafaza u horizontalnom položaju. B) Rana prometafaza u vertikalnom položaju.

4.3.3. FRAP PRC1-GFP u svežnju u metafazi

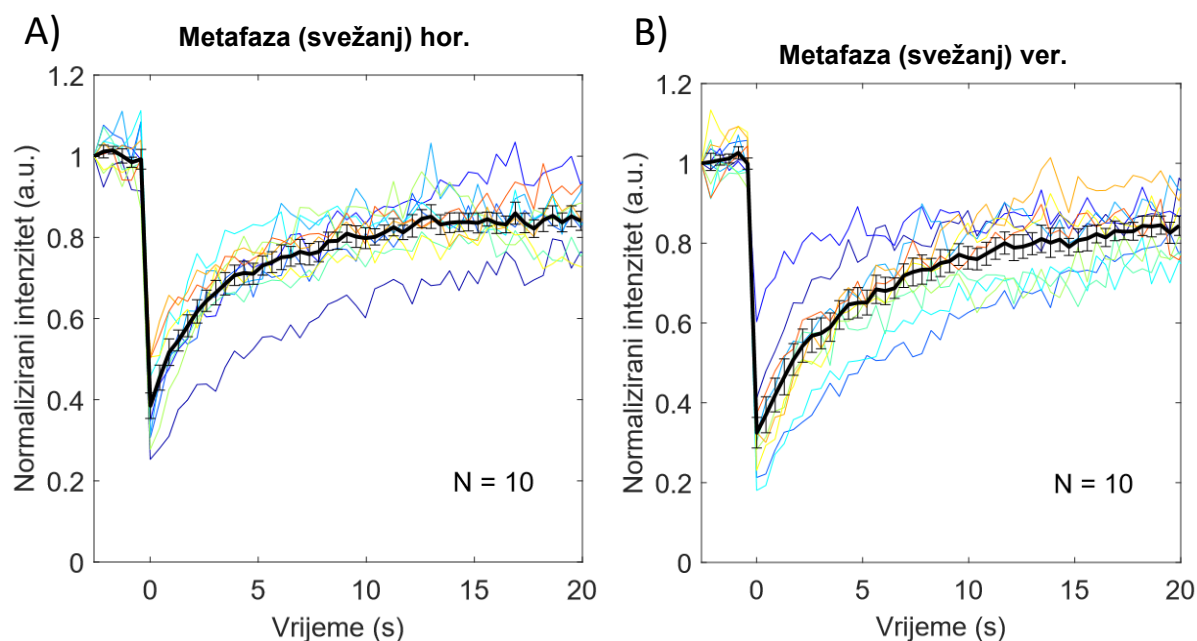
Za protein PRC1-GFP dugo se smatralo da nema ulogu prije nego se kromatide počnu odvajati na početku anafaze. Međutim, otkriveno je da PRC1-GFP specifično povezuje antiparalelne preklope mikrotubula koji tvore premošćujuće vlakno.^{13,16} Također, PRC1-GFP je ključan za održavanje ravnoteže sila u metafaznom vretenu. U slučaju njegovog reverzibilnog uklanjanja¹⁶ dolazi do dislociranja kinetohora koje su prethodno bile složene u metafaznu ploču i izravnavanja kinetohornog vlakna, što su eksperimentalni pokazatelji neravnoteže sila na kinetohore. Da bi došlo do reverzibilnog odvajanja i vezanja proteina na vreteno, nužno je da određena frakcija tog proteina nije čvrsto vezana na vreteno. U ovom radu metafaza je prepoznata po lokalizaciji kromosoma u središtu vretena u horizontalnom i vertikalnom položaju (slika 4.7), te je na dobro vidljivom svežnju proveden FRAP eksperiment (slike 4.25 i 4.26), a dobivene krivulje prikazane su na slici 4.27. Pritom je za svaku fazu uprosječeno 10 eksperimenata.



Slika 4.25. FRAP za PRC1-GFP u metafazi u svežnju horizontalnom položaju. A) Diobeno vreteno na početku snimanja u vremenu -2,60 s, te nakon fotoizbljeđenja (0,00 – 20,78 s). ROI je označena bijelim krugom. B) Uvećana ROI sa slike A. Skala je 1 μm .



Slika 4.26. FRAP za PRC1-GFP u svežnju u metafazi u vertikalnom položaju. A) Diobeno vreteno na početku snimanja u vremenu -2,60 s, te nakon fotoizbljedenja (0,00 – 20,78 s). ROI je označena bijelim krugom. B) Uvećana ROI sa slike A. Skala je 1 μm.

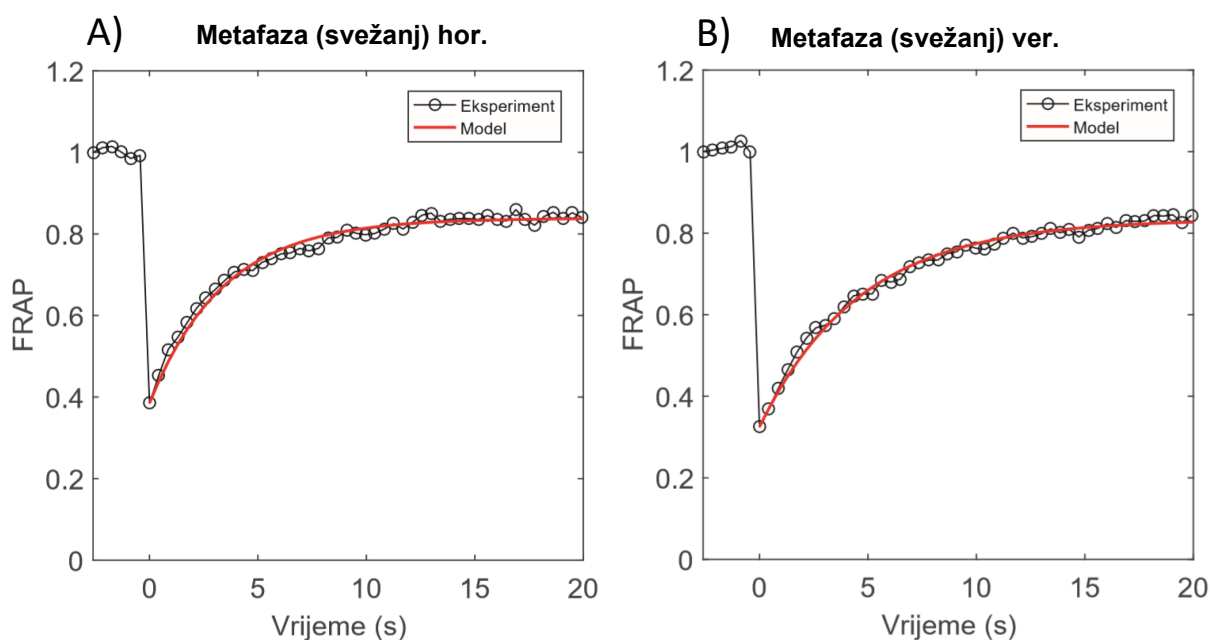


Slika 4.27. FRAP krivulja za PRC1-GFP u svežnju u metafazi. A) Vreteno u horizontalnom položaju. B) Vreteno u vertikalnom položaju. Prikazana je srednja vrijednost i standardna pogreška u svakoj vremenskoj točki (crno).

Krivulja dobivena modelom (tablica 4.4 i slika 4.28) i eksperimentalna krivulja u iznimno su dobrom slaganju za oba položaja vretena. Očekivano, mobilna frakcija je manja nego u prometafazu te iznosi (74 ± 2) % od ukupnog broja molekula PRC1-GFP u metafaznom vretenu u horizontalnom položaju, odnosno (75 ± 2) % za vertikalni položaj. Vrijeme polureakcije veće je odnosu na ranije faze stanične diobe i iznosi $(2,4 \pm 0,3)$ s za horizontalni položaj, odnosno $(3,2 \pm 0,6)$ s za vertikalni položaj. Svakako treba istaknuti i sličnost u iznosu parametra a , b i F_0 između vertikalno i horizontalno položenog vretena, što dovodi i do toga da su udjeli mobilne i imobilne faze slični. Time je isključeno da položaj vretena na neki način utječe na vrijednost FRAP-a.

Tablica 4.4. Parametri modela i statistička evaluacija za FRAP u svežnju u metafazi. F_0 , A i b su dani kao (koeficijent \pm interval pouzdanosti od 95%).

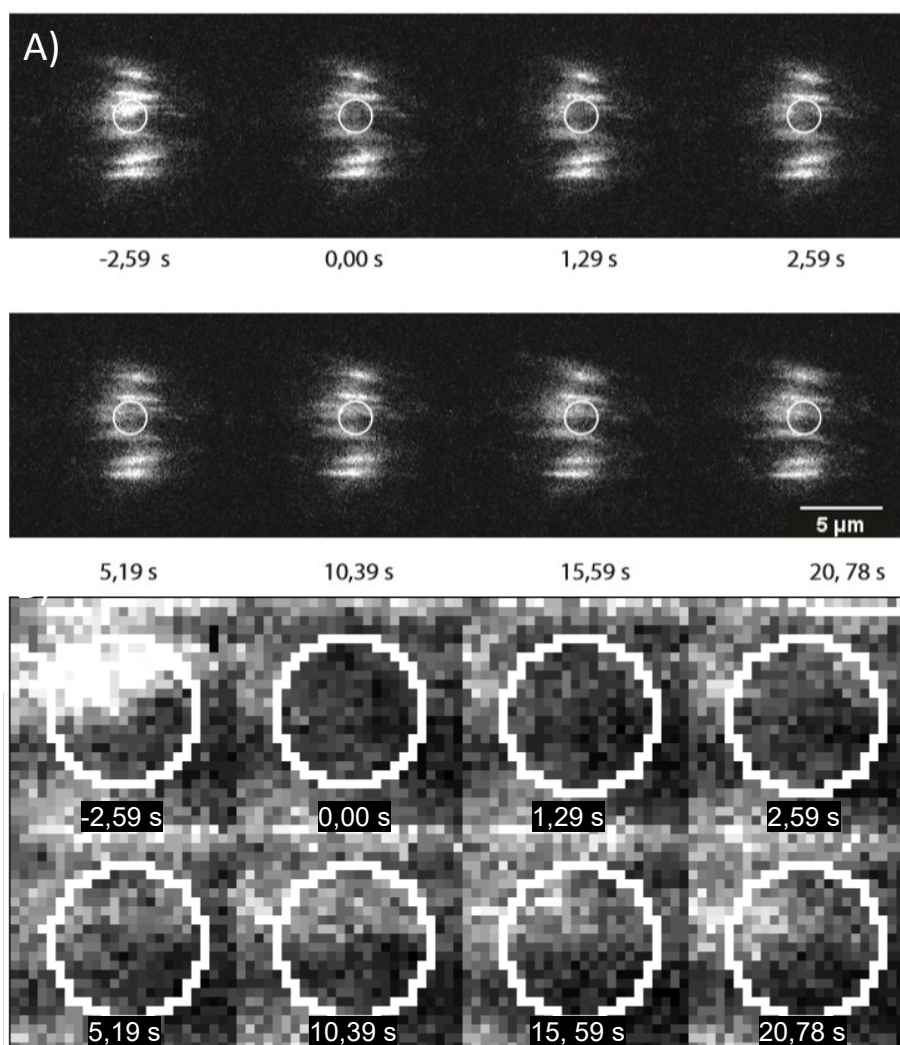
Parametri	Metafaza (svežanj) hor.	Metafaza (svežanj) ver.
F_0	$0,39 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,02$
A	$0,453 \pm 0,007$	$0,509 \pm 0,008$
b / s^{-1}	$0,29 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$
$F_\infty (F_0 + A)$	$0,84 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,2$
SSE	0,009	0,007
R^2	0,98	0,99
modificirani R^2	0,98	0,99
RMSE	0,01	0,01



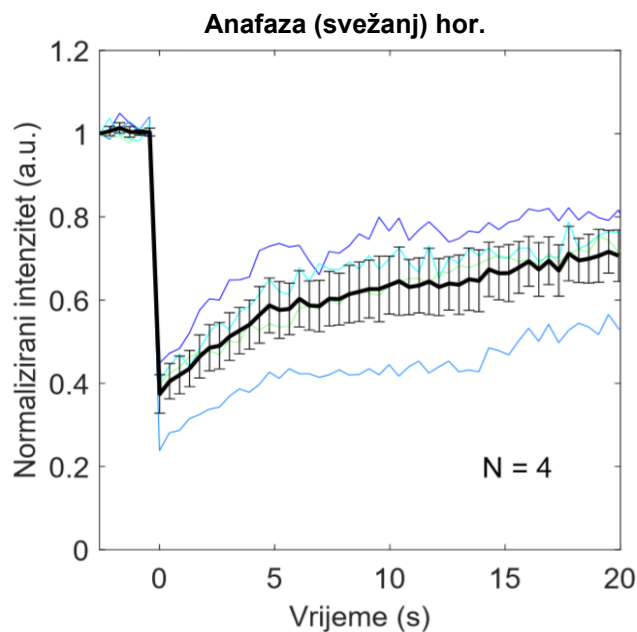
Slika 4.28. Model za FRAP PRC1-GFP u svežnju u metafazi. A) horizontalni i B) vertikalni položaj.

4.3.4. FRAP PRC1-GFP u svežnju u anafazi

FRAP PRC1-GFP u anafazi ponovljen je u 4 neovisna eksperimenta. Iz same sekvence slika jasno je da postoji određena mobilna frakcija koja se izmijeni u ROI nakon fotoizbljeđenja (slika 4.29). Eksperimentalna krivulja dobivena kao prosjek normalizirana intenziteta u vremenu iz 4 neovisna eksperimenta prikazana je na slici 4.30. Razlike u odnosu na krivulju u ranijim fazama u nagibu kao i maksimalnoj vrijednosti koja se postiže jasne su iz samog izgleda, što sugerira i razlike u mobilnoj frakciji i brzini vezanja PRC1-GFP na vreteno.



Slika 4.29. FRAP za PRC1-GFP u svežnju u anafazi. A) Diobeno vreteno na početku snimanja u vremenu - 2,60 s, te nakon fotoizbljeđenja (0,00 – 20,78 s). ROI je označena bijelim krugom. B) Uvećana ROI sa slike A. Skala je 1 µm.

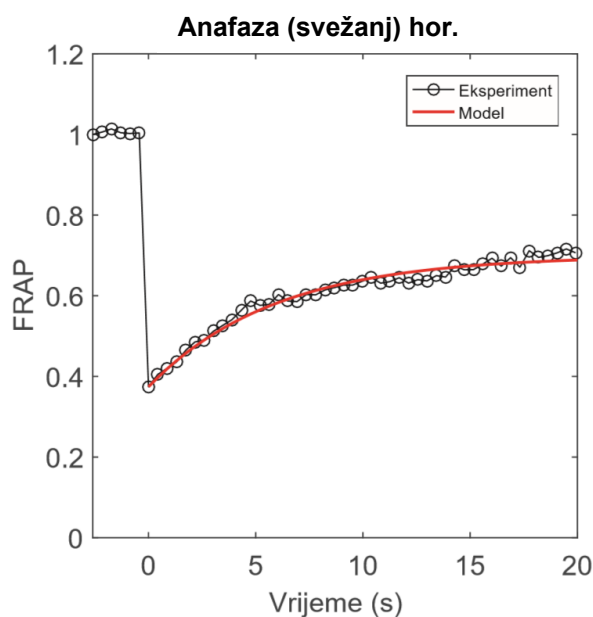


Slika 4.30. FRAP krivulja za PRC1-GFP u svežnju u anafazi. Prikazana je srednja vrijednost i standardna pogreška u svakoj vremenskoj točki (crno).

Model dobiven za FRAP PRC1-GFP u anafazi dobiven je metodom nelinearne regresije i parametri su dani u tablici 4.5, a krivulja je prikazana na slici 4.31. Slaganje modela i eksperimenta je zadovoljavajuće, no eksperimentalna krivulja pred sam kraj pokazuje da nije došlo do postizanja potpunog platoa. Nažalost, nije bilo moguće stanice snimati duže jer su se zbog dinamike diobe pomicala u vidnom polju po Z-osi i time se ROI gubio iz ravnine snimanja.

Tablica 4.5. Parametri modela i statistička evaluacija za FRAP PRC1-GFP u svežnju u anafazi F_0 , A i b su dani kao (koeficijent \pm interval pouzdanosti od 95%).

Parametri	Anafaza (svežanj) hor.
F_0	$0,37 \pm 0,09$
A	$0,33 \pm 0,01$
b / s^{-1}	$0,17 \pm 0,02$
$F_\infty (F_0 + A)$	$0,70 \pm 0,09$
SSE	0,009
R^2	0,97
modificirani R^2	0,97
RMSE	0,015



Slika 4.31. Model za FRAP PRC1-GFP u svežnju u anafazi.

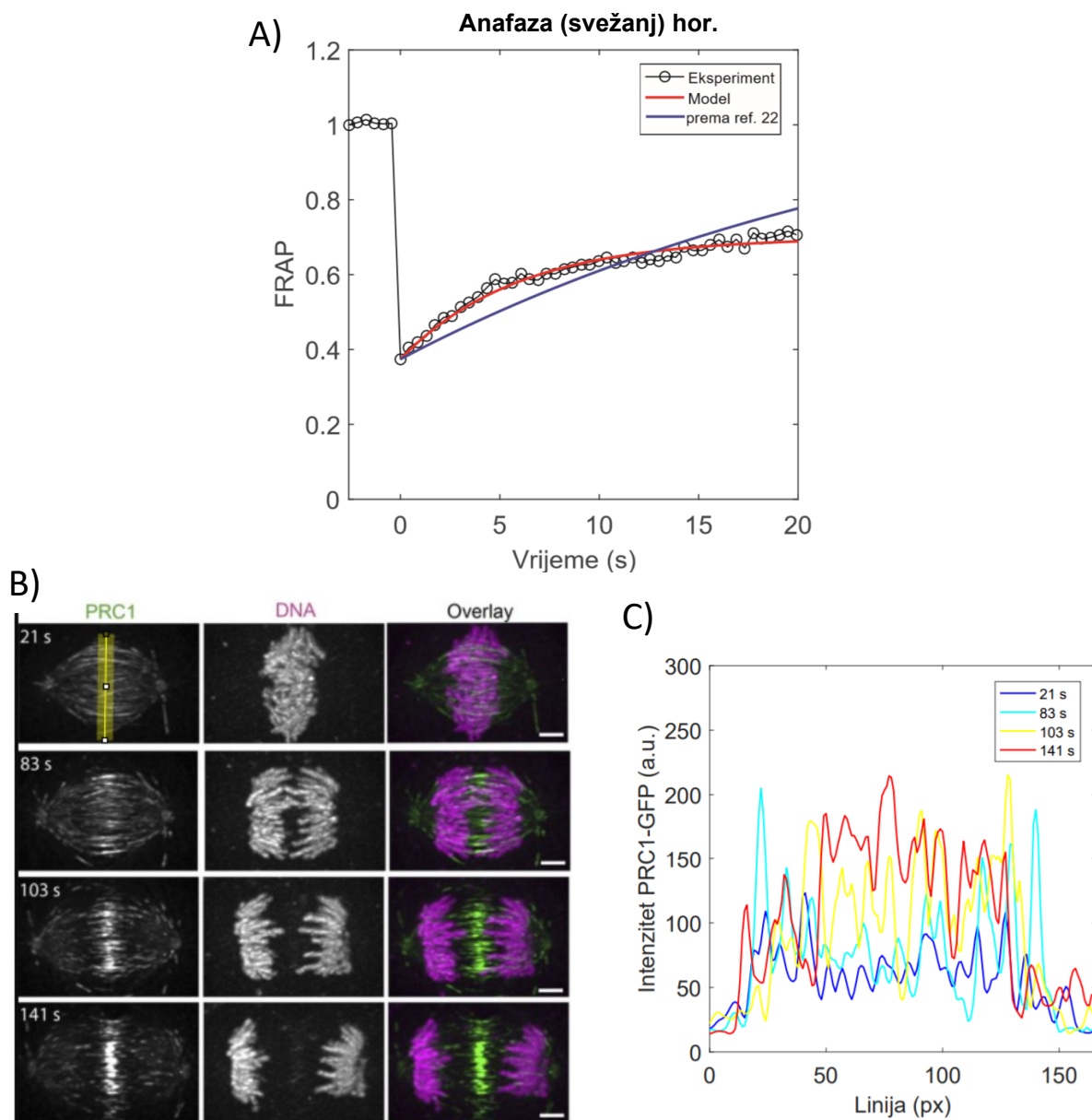
U odnosu na ranije faze gdje je većina dostupnog PRC1-GFP u mobilnoj frakciji, a anafazi je gotovo pola dostupnog PRC1-GFP u ravnotežnoj asocijaciji i disocijaciji s vretena, točnije (52 ± 1) %. Na antiparalelne preklope u središnjem dijelu vretena čvrsto je vezano (48 ± 1) % molekula PRC1. Vrijeme potrebno da se polovina dostupnih molekula asociira na vreteno je veće u anafazi u odnosu na ranije faze i iznosi ($4,1 \pm 0,9$) s. Budući da je eksperimentalna krivulja pokazuje blagi nagib u vremenu 15-20 s, jasno je da je da bi za bolje slaganje s teorijom bilo potrebno produžiti snimanje.

U literaturi je više puta naglašeno da $t_{1/2}$, nije mjera koja se može uspoređivati između različitih radova jer ovisi o nizu eksperimentalnih parametara poput veličine izblijeđene regije, vrste lasera i sl.^{32,33} Neslaganje između krivulje dobivene u ovom radu i radu Pamule i suradnika²² prikazano je na slici 4.32.A. U tom radu (slika 2A u članku²²) autori koriste pravokutnik kako bi označili regiju od interesa, koji pak zahtjeva puno složeniju obradu podataka³³ u odnosu na krug koji je korišten u ovom radu. Upravo iz tog razloga vrijeme polureakcije za određeni protein smatra se relevantnom mjerom koja je usporediva u različitim fazama samo unutar jednog rada gdje je korišten identičan sustav i veličina ROI. Također, autori daju potpunu jednadžbu za samo jednu stanicu, tj. nije riječ o uprosječnoj krivulji od više eksperimenata, nego samo jednom eksperimentu. Ta krivulja pokazuje da je mobilna faza PRC1 u anafazi $\sim 80\%$, što je značajno više u odnosu na ovaj rad. Autori zapravo naglasak stavljaju na $t_{1/2}$ koje mjere u sekundama i naglašavaju kako je PRC1 dinamičniji od tubulina na koji se veže jer tubulin u različitim radovima ima $t_{1/2}$ mjereno u minutama. Ono što je bitno naglasiti je 3 puta dulje vrijeme snimanja FRAP-a u odnosu na ovaj rad. Autori naglašavaju da

koncentracija PRC1-GFP ostaje ista na mikrotubulima unutar 60 sekundi i da opaženim skraćivanjem antiparalelnog preklopa ne dolazi do nakupljanja PRC1-GFP u toj regiji. Iako slike anafaze prikazane na slici 1A u članku u vremenu sugeriraju da skraćivanjem antiparalelnog preklopa dolazi do povećavanja intenziteta signala PRC1-GFP (slika 4.32), autori taj podatak ne mjere, već se pozivaju na literaturu²⁰ gdje je takvo mjerenje rađeno *in vitro*. U citiranom radu pak konkretno mjerenje nije pokazano, već je samo komentirano.

Kako bi se ova pretpostavka potvrdila, na slici 4.32.B preuzetoj iz slike 1A iz članka²² u središnjoj regiji na koju se veže PRC1-GFP povučen je profil intenziteta u programu *ImageJ* i prikazan na grafu 4.32.C. Iz grafa je jasno da u datom vremenskom periodu dolazi do značajnog porasta intenziteta signala PRC1 -GFP. Stoga, FRAP krivulja dobivena u 60 sekundi nije samo rezultat oporavka fluorescencije na datom mjestu, već i procesa nakupljanja PRC1 u antiparalelnom preklopu u anafazi. Uzimajući u obzir značajne razlike *in vivo* i *in vitro* istraživanja, prikaz svega jedne stanice na grafu, te nedostatak mjerenja intenziteta fluorescencije, može se zaključiti da krivulja koja ukazuje na značajno višu mobilnu fazu PRC1-GFP u radu Pamule i suradnika nije dostatna za objasniti mobilnost PRC1-GFP.

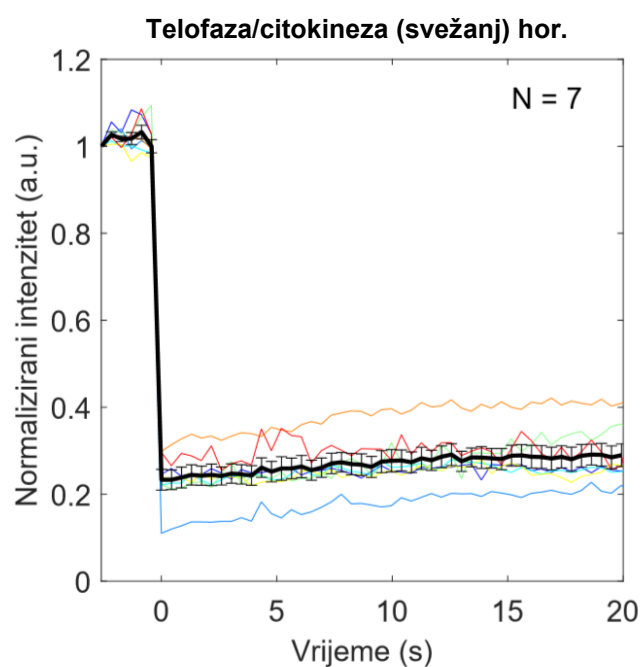
Budući da je uloga PRC1 značajna u anafazi, slična istraživanja rađena su ranije i u drugim organizmima. Tako je za homolog PRC1 u kvascu, Ase1 u anafazi dobiveno vrijeme polureakcije $t_{1/2} \sim 7,5$ min.⁴⁴ Ta vrijednost ukazuje na značajno manju dinamiku Ase1 u odnosu na PRC1, čija se vrijednost $t_{1/2}$ u ljudskim stanicama, neovisno o različitim eksperimentalnim pristupima, uvijek mjeri u sekundama u anafazi. Zanimljivo je da Ase1 u interfazi i na astralnim mikrotubulima koji ne čine antiparalelnu središnju zonu u kvascu ima vrijeme polureakcije u sekundama⁴⁴, što sugerira da je dinamika Ase1 i PRC1 kada nisu vezani jakim interakcijama u antiparalelni preklap slična.



Slika 4.32. A) Usporedba modela za FRAP PRC1-GFP u anafazi dobivenih u ovom radu i radu prema ref. 22. B) Stanica hTRET-RPE1 u anafazi. Preuzeto iz ref. 22. C) Profil intenziteta signala PRC1-GFP koji odgovara stanici pod B). Širina žute linije je 25 piksela, a duljina 166 piksela.

4.3.5. FRAP PRC1-GFP u svežnju u telofazi/citokinezi

FRAP eksperiment napravljen je i za 7 stanica u telofazi/citokinezi (slika 4.12), te je izračunata prosječna vrijednost u svakom vremenskom okviru prikazana na slici 4.33. Već iz same eksperimentalne krivulje koja ne doseže visoke vrijednosti nakon fotoizbljeđenja jasno je da je frakcija mobilnog proteina PRC1-GFP u stanicama mala, tj. da je većina PRC1-GFP čvrsto vezana na središnje tijelo.

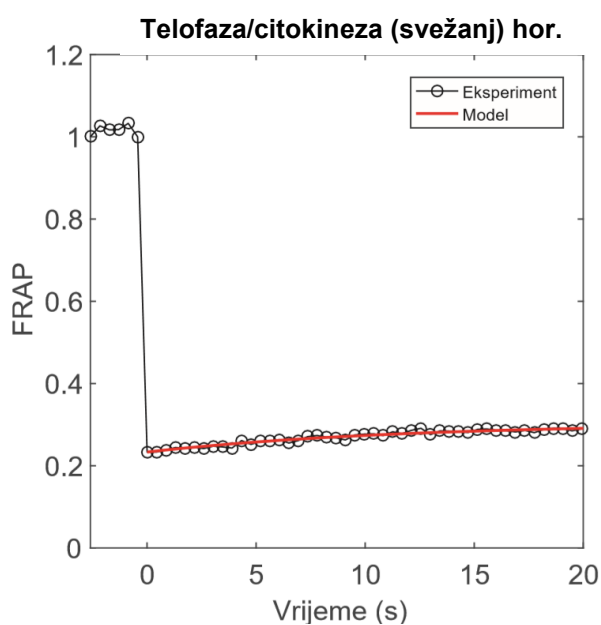


Slika 4.33. FRAP krivulja za PRC1-GFP u svežnju u telofazi/citokinezi. Prikazana je srednja vrijednost i standardna pogreška u svakoj vremenskoj točki (crno).

Kao i u ranijim fazama, izračunati su parametri metodom nelinearne regresije koji će dati najbolje slaganje eksperimentalne krivulje i kinetičkog modela. Parametri i statističke mjere za evaluaciju kvalitete slaganja modela i eksperimentalnih podataka dane su u tablici 4.6, a krivulja dobivena korištenjem kinetičkog modela prikazana je na slici 4.16. Mjere kvalitete slaganja eksperimentalnih podataka i teorijskih izračuna pokazuju da dobivena krivulja vjerodostojno opisuje eksperimentalne podatke.

Tablica 4.6. Parametri modela i statistička evaluacija za FRAP PRC1-GFP u svežnju u u telofazi/citokinezi. F_0 , A i b su dani kao (koeficijent \pm interval pouzdanosti od 95%).

Parametri	Telofaza/citokineza
F_0	$0,2 \pm 0,1$
A	$0,07 \pm 0,01$
b / s^{-1}	$0,09 \pm 0,02$
$F_\infty (F_0 + A)$	$0,3 \pm 0,1$
SSE	0,0009
R^2	0,94
modificirani R^2	0,94
RMSE	0,005

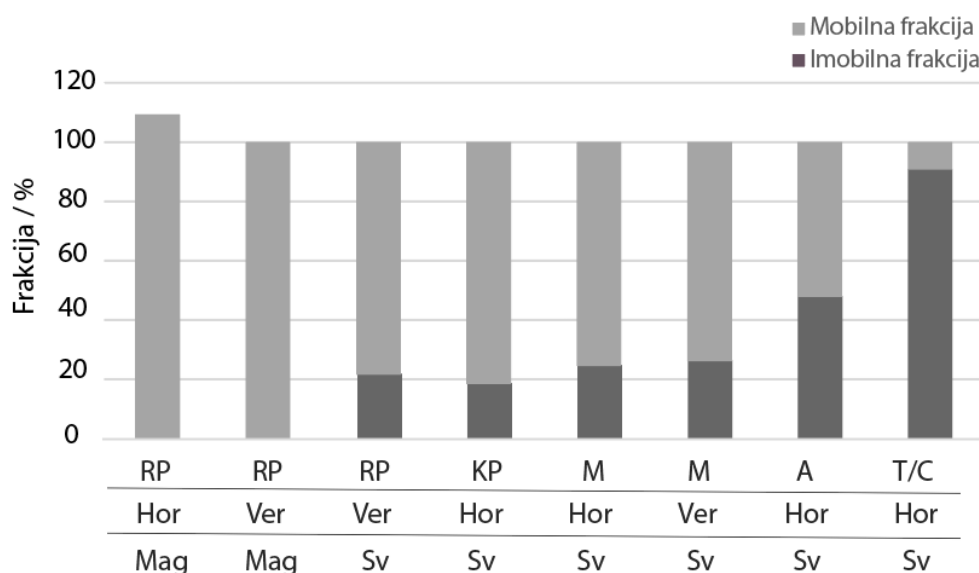


Slika 4.34. Model za FRAP PRC1-GFP u svežnju u telofazi/citokinezi.

Iz dobivenih parametara može se iščitati mobilna i imobilna frakcija PRC1-GFP u citokinezi premajednadžbama (1) i (2). Mobilno je $(91 \pm 3) \%$ PRC1-GFP i vezano je jakim interakcijama na mikrotubule u središnjem tijelu vretena. Vrijeme polureakcije je daleko veće u odnosu na prethodne faze i iznosi (8 ± 2) s.

4.3.6. Usporedba biofizikalnih svojstava PRC1-GFP dobivenih na osnovu FRAP eksperimenta unutar različitih faza mitoze

Da bi se u potpunosti shvatili parametri FRAP eksperimenta za PRC1-GFP u različitim fazama mitoze dobiveni prethodnom analizom, potrebno ih je sumirati. Razumijevanje parametara FRAP-a omogućuje razmatranje biofizičkih modela koji će dati informacije o ponašanju proteina u stanici. Važan rezultat FRAP-a svakako su informacije o mobilnoj i imobilnoj frakciji proteina u stanici. Za slučaj PRC1-GFP imobilna frakcija raste kako se odmiču faze mitoze, te je u citokinezi maksimalna (slika 4.35). Također, smanjuje se i koncentracija PRC1-GFP u citoplazmi (poglavlje 4.2.4), te ga se sve više nalazi na području vretena, što ukazuje da postoji koncentracijski gradijent u smjeru vretena, uzrokovan vezanjem PRC1-GFP. Kako odmiču faze mitoze, postoji veći afinitet PRC1-GFP za vezanje na vreteno, što je vjerojatno posredovano djelovanjem mitotskih ciklinskih kaskada i dimerizacijom PRC1. Vrijeme polureakcije pokazuje suprotan trend i povećava se kako odmiču faze mitoze (tablica 4.7).



Slika 4.35. Mobilne i imobilne frakcije PRC1-GFP kroz faze mitoze. Oznake: RP-rana prometafaza, KP-kasna prometafaza, M-metafaza, A-anafaza, T/C-telofaza/citokineza, Hor-horizontalni položaj vretena, Ver-vertikalni položaj vretena, Mag-magličasta forma, Sv-svežanj mikrotubula.

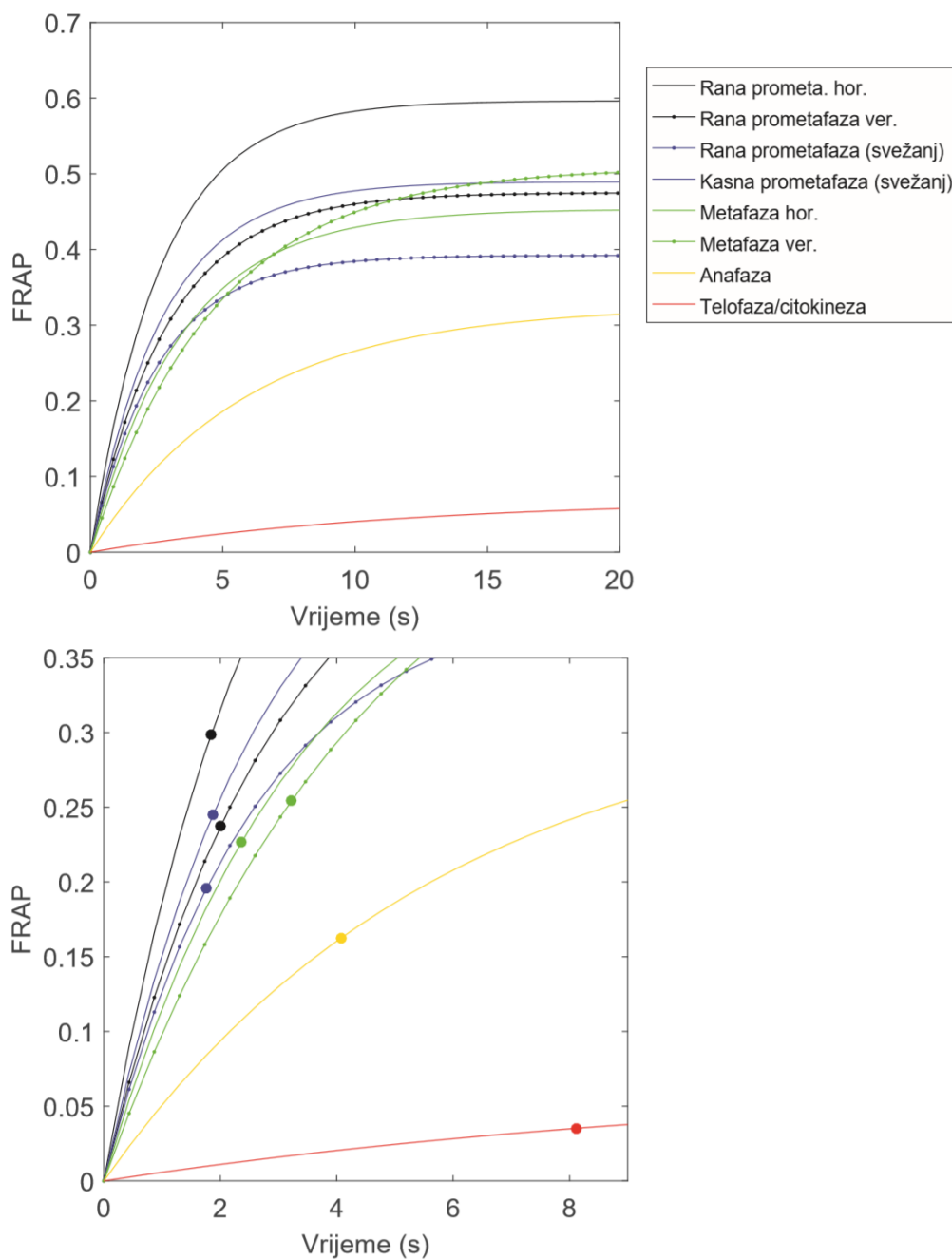
Tablica 4.7. Vremena polureakcija za PRC1-GFP kroz faze mitoze. Vrijednosti su dane kao (koeficijent \pm SEM).

Faza	Položaj vretena	Forma u veretenu	Vrijeme polureakcije (s)
<i>Rana prometafaza</i>	Horizontalno	Magličasta forma	$1,8 \pm 0,3$
	Vertikalno	Magličasta forma	$2,0 \pm 0,4$
	Vertikalno	Svežanj	$1,8 \pm 0,3$
<i>Kasna prometafaza</i>	Horizontalno	Svežanj	$1,9 \pm 0,3$
<i>Metafaza</i>	Horizontalno	Svežanj	$2,4 \pm 0,3$
	Vertikalno	Svežanj	$3,2 \pm 0,6$
<i>Anafaza</i>	Horizontalno	Svežanj	$4,1 \pm 0,9$
<i>Telofaza/citokineza</i>	Horizontalno	Svežanj	8 ± 2

Svakako je potrebno istaknuti da je sav PRC1-GFP koji se nalazi u magličastoj strukturi u ranoj prometafazi mobilan. Osim mobilnih i imobilnih frakcija, bitno je i vrijeme potrebno da se polovina mobilnog PRC1-GFP vrati u ROI nakon fotoizbljeđenja, $\tau_{1/2}$, u ovim eksperimentalnim uvjetima. Radi prikazivanja relativnih odnosa za $\tau_{1/2}$, sve krivulje dobivene modelom za FRAP prikazane su na slici 4.36.A na način da su translahirane za $-F_0$. Dio grafa je uvećan i označene su točkom vrijednosti koje odgovaraju ($\tau_{1/2}, FRAP(\tau_{1/2})$) za svaki set eksperimenata. Vrijeme polureakcije, $\tau_{1/2}$ najmanje je za ranu prometafazu (slika 4.36.B i tablica 4.7) što sugerira da je opravak fluorescencije jako brz, moguće zbog velike mobilnosti PRC1-GFP. Potpuna mobilnost, odnosno potpuni povratak fluorescencije na vrijednost F_i sugerira da kinetički model predložen u poglavlju 2.3.3. možda nije najbolji kao biološki model za ranu prometafazu jer se njime smatra da je difuzija zanemariva, te da je riječ o reakcijom dominiranoj kinetici. Kako bi se detaljno razumjelo ponašanje PRC1-GFP u magličastoj strukturi potrebno je razmotriti i druge modele koji uključuju difuziju,³⁴ te statistički evaluirati slaganje modela i eksperimentalnih podataka. U tom slučaju mogli bi se dobiti i fizikalni parametri koji imaju značenje za biokemiju PRC1, a ne samo svojstva FRAP-a. Također, bitno je opaziti da je mobilnost manja, a $\tau_{1/2}$ veće za PRC1-GFP koji se nalazi u svežnju u prometafazi. Vrijednosti su usporedive za svežanj u ranoj prometafazi i kasnoj prometafazi, što ukazuje da za vrijeme prometafaze nastaju svežnjevi koji na sebe vežu sve više PRC1-GFP iz mobilne faze. Također, moguće je da PRC1-GFP ima ulogu povezivanja svežnjeva prije metafaze, te da nije samo pasivni povezujući protein, što bi svakako trebalo dodatno ispitati. Biofizička svojstva PRC1-GFP u svežnjevima u metafazi, mobilnost i $\tau_{1/2}$, usporedivi su sa svojstvima za svežnjeve u prometafazi, što pokazuje da FRAP može biti dobar eksperiment za utvrđivanje svojstava svežnja mikrotubula. Tome u prilog idu i nesignifikantne razlike u parametrima koji su dobiveni za svežnjeve u vertikalnom i

horizontalnom položaju. Time je pokazano da se dobivaju usporedivi rezultati neovisno o položaju vretena u odnosu na stakalce.

Parametar b , a time i vrijeme polureakcije $\tau_{1/2}$ u kontekstu ovog rada, samo je relativna mjera koja se može usporediti između faza unutar istog eksperimenta, a ne može se iz nje izračunati vrijednost k_{on}^* i k_{off} dok se ne ispita i slaganje s drugim kinetičkim modelima, što pak zahtjeva puno složenije fizikalne račune koji nadilaze ovaj rad. Ipak, mogu se razmotriti relativni odnosi parametara, te zaključiti da stopa vezanja i odvezivanja PRC1-GFP s vretena opada kako odmiču faze mitoze. PRC1-GFP pokazuje sve veći afinitet vezanja i time omogućuje nastanak stabilnih antiparalelnih svežnjeva mikrotubula.



Slika 4.36. Modeli za FRAP krivulju kroz faze mitoze. A) Krivulje modela za FRAP translirane za odgovarajući $-F_0$. B) Uvećani dio grafa. Točkama su naznačene vrijednosti za $(\tau_{1/2}, FRAP(\tau_{1/2}))$.

4.3.7. Prijedlog za buduća istraživanja

Jedno od ključnih pitanja svakako ostaje je li PRC1-GFP u ranijim fazama od anafaze monomer ili dimer, odnosno postoje li 2 mikrotubula koja su vezana dimerom PRC1 prije anafaze. Kako bi se detaljnije shvatila uloga dimerizacije u ponašanju PRC1-GFP u stanici, trebalo bi ponoviti FRAP eksperiment na način da se napravi mutant PRC1-GFP koji ne može dimerizirati. Takvi mutanti poznati su u literaturi.¹⁹ Moguće je utišati ekspresiju funkcionalnog PRC1-GFP, primjerice metodom interferirajuće siRNA specifične za PRC1-GFP i u istim stanicama eksprimirati plazmid koji nosi uputu za biosintezu PRC1-GFP kojem je deletiran N-kraj, tj. prvih 66 aminokiselina koje čine dimerizacijsku domenu.¹⁸ Takav mutant PRC1- Δ N-GFP, trebao bi ostati monomer kroz sve faze mitoze i bilo bi zanimljivo vidjeti kojim afinitetom se veže na vreteno. Usporedbom s ponašanjem funkcionalnog PRC1-GFP u ranijim fazama moglo bi se zaključiti i u kojoj mjeri PRC1-GFP dimerizira kroz faze, te koliko je dimerizacija ključna za njegovo vezanje na vreteno.

FRAP eksperiment pokazao se kao jednostavna, brza i pouzdana metoda za utvrđivanje različitih biofizičkih svojstava istog proteina u različitim fazama diobe. Primjerice, FRAP bi mogao biti mjera za proučavanje utjecaja drugih proteina na antiparalelne svežnjeve. Ako se metodom interferirajuće RNA utiša neki od proteina za koji se pretpostavlja da je u interakciji s PRC1-GFP (npr. KIF4A) mogao bi se u tim stanicama mjeriti FRAP-PRC1-GFP da se vidi utjecaj na afinitet vezanja PRC1-GFP za mikrotubule u takvim uvjetima.

Kao značajno pitanje ostaje i funkcija i značaj magličaste forme na početku diobe. U daljnjem radu za razumijevanje magličaste forme, potrebno je usporediti različite modele kinetike i mutanate PRC1-GFP. Time bi se stekao uvid i u mehanizam fokusiranja te magličaste strukture u stabilne svežnjeve koje je moguće opaziti u kasnijim fazama mitoze. Ujedno, razjasnila bi se i uloga PRC1-GFP u nastanku antiparalelnih svežnjeva, što svakako ostavlja prostora za buduća istraživanja.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu proučavana je lokalizacija i dinamika ponašanja proteina PRC1-GFP u svim fazama mitoze u stanicama HeLa sa stabilnom ekspresijom PRC1-GFP. PRC1-GFP u prometafazi lokalizira u cijelom području vretena. U određenim dijelovima intenzitet signala je značajno jači. Za takve dijelove vretena pretpostavljeno je da odgovaraju prvim formiranim svežnjevima mikrotubula povezanih s PRC1-GFP sličnima onim u metafazi što je potvrđeno kao ispravna hipoteza analizom podataka za FRAP PRC1-GFP. U ranoj prometafazi uočljivi su dijelovi unutar kojih nisu formirani svežnjevi, već se PRC1-GFP nalazi u nestrukturiranoj magličastoj strukturi. Pokazano je da je riječ o mobilnom PRC1, koji nije čvrsto vezan na mikrotubule. Još uvijek ostaje pitanje koje vrste interakcija i kolikog intenziteta drže takav PRC1-GFP na okupu.

Kako se odmiču faze mitoze, sve je manje PRC1-GFP u citoplazmi, a sve je više PRC1-GFP lokalizirano na vretenu. Također, afinitet prema čvrstom vezanju na vreteno pojačava se kako odmiču faze mitoze; sve je više PRC1-GFP imobilno, a vrijeme zadržavanja u vezanoj formi je dulje. Time je pokazano da PRC1-GFP mijenja svojstva i afinitet vezanja za vrijeme diobe. FRAP kao metoda može poslužiti za proučavanje razlika u biofizikalnim svojstvima proteina na kratkoj vremenskoj skali, bez da se utječe biokemijske procese u stanici.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

BAC – bakterijski umjetni kromosom (engl. *bacterial artificial chromosome*)

EGFP – poboljšani zeleni fluorescentni protein (engl. *enhanced green fluorescent protein*)

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

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

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

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

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

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

SiR-DNA – boja za DNA na bazi silikon-rodamina

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 6th edition, New York, Garland Science (2014)
2. M. Kirschner, T. Mitchison, *Cell* **45(3)** (1986) 329-324.
3. N. Pavin, I. M. Tolić -Nørrelykke, *Syst Synth Biol* **8(3)** (2014) 179-186.
4. C. E. Walczak, S. Cai, A. Khodjakov, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11(2)** 91-102.
5. N. Pavin, I. M. Tolić, *Annu Rev Biophys* **45** (2016) 279-298.
6. K. L. McDonald, E. T. O'Toole, D. N. Mastronarde, J. R. McIntosh, *J Cell Biol* **118** (1992) 369-383.
7. I. M. Tolić, *Eur Biophys J* **47** (2018) 191-203.
8. B. R. Brinkley, J. Jr. Cartwright, *Ann N Y Acad Sci* **253** (1975) 428-439.
9. M. E. Tanenbaum, R. H. Medema, *Dev Cell* **19(6)** (2010) 797-806.
10. J. Li, M. Dallmayer, T. Kirchner, J. Musa, T. G. P. Grünwald, *TRECAN* **4(1)** (2017) 59-37.
11. D. N. Mastronarde, K. L. McDonald, R. Ding, J. R. McIntosh, *J Cell Biol* **123(6)** (1993) 1475-1489.
12. J. R. McIntosh, S. C. Landis, *J Cell Biol* **49(2)** (1971) 468-497.
13. J. Kajtez, A. Solomatina, M. Novak, B. Polak, K. Vukušić, J. Rüdiger, G. Cojoc, A. Milas, I. Šumanovac Šestak, P. Risteski, F. Tavano, A. H. Klemm, E. Roscioli, J. Welburn, D. Cimini, M. Glunčić, N. Pavin, I. M. Tolić, *Nat Commun* **7** (2016) 1-11.
14. M. Jagrić, P. Risteski, J. Martinčić, A. Milas, I. M. Tolić, *bioRxiv* 865394 (2019)
15. K. Vukušić, R. Buđa, A. Bosilj, A. Milas, N. Pavin, I. M. Tolić, *Dev Cell* **43(1)** (2017) 11-23.
16. B. Polak, P. Risteski, S. Lesjak, I. M. Tolić, *EMBO Rep* **18(2)** (2017) 217-230.
17. W. Jiang, G. Jimenez, N. J. Welles, T. J. Hope, G. M. Whal, T. Hunter, R. Fukunaga, *Mol Cell* **2(6)** (1998) 877-885.

18. C. Zhu, E. Lau, R. Schwarzenbacher, E. Bossy-Wetzel, W. Jiang, *PNAS* **103(16)** (2006) 6196-6201.
19. E. H. Kellog, S. Howes, S. C. Ti, E. Ramirez-Aportela, T. M. Kapoor, P. Chacon, E. Nogales, *PNAS* **113(34)** (2016)
20. R. Subramanian, S. C. Ti, L. Tan, S. A. Darst, T. M. Kapoor, *Cell* **154(2)** (2013) 377-390.
21. J. Simunić, I. M. Tolić, *Trends Biochem Sci* (2016)
22. M. C. Pamula, L. Carlini, S. Forth, P. Verma, S. Suresh, W. R. Legant, A. Khodjakov, E. Betzig, T. M. Kapoor, *J Cell Biol* **218(8)** 2529-2544.
23. R. Uehara, G. Goshima, *J Cell Biol* **191(2)** (2010) 259–267.
24. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th edition, W. H. Freeman and company, New York, (2013) 529-562.
25. M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M.D. Bootman, *Cold Spring Harb Protoc* **10** (2014) 526-541.
26. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram) (datum pristupa: 10.3.2020.)
27. Y. Engelborghs, A. J. W. G. Visser, *Fluorescence Spectroscopy and Microscopy*, Springer Science+Business Media, LLC (2014) 371-417.
28. G. Lukinavičius, C. Blaukopf, E. Pershagen, A. Schena, L. Reymond, E. Derivery, M. Gonzalez-Gaita, E. D'Este, S. W. Hell, D.W. Gerlich, K. Johnsson, *Nat Commun* **6 (8497)** (2015) 1-7.
29. M. Ormö, A.B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **273(5280)** (1996) 1392–5.
30. S. J. Remington, *Protein Sci* **20(9)** (2011) 1509–1519.
31. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/press-release/> (datum pristupa: 19.4.2020.)
32. N. Lorén, J. Hagman, J. K. Jonasson, H. Deschout, D. Bernin, F. Cella-Zanacchi, A. Diaspro, J. G. McNally, M. Ameloot, N. Smisdom, M. Nydén, A. M.Hermansson, M.

- Rudemo, K. Braeckmans, *Q Rev Biophys* **48(3)** (2015) 323-387.
33. D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb, *Biophys J* **16** (1976) 1050-1069.
34. B. L. Sprague, R. L. Pego, D. A. Staverva, J. G. McNally, *Biophys J* **86** (1976) 3473-3495.
35. A. Bancaud, S. Huet, G. Rabut, J. Ellenber, *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*, Second, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 67-93.
36. <https://www.mathworks.com/products/curvefitting.html> (datum pristupa: 2.4.2020.)
37. <https://www.mathworks.com/help/curvefit/evaluating-goodness-of-fit.html> (datum pristupa: 2.4.2020.)
38. G. Itoh, M. Ikeda, K. Iemura, M. Abdullahel Amin, S. Kuriyama, M. Tanaka, N. Mizuno, H. Osakada, T. Haraguchi, K. Tanaka, *Sci Rep* **8** (2018)
39. M. Kang, M. Andreani, A. K. Kenworthy, *PLoS ONE* **10(5)** (2015)
40. R. D. Phair, T. Misteli, *Nature* **404** (2000) 603-609.
41. H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G. P. C. Drummen, *Molecules* **17** (2012) 4047-4132.
42. Salmon, E.D., R.J. Leslie, W.M. Saxton, M.L. Karow, and J.R. McIntosh, *J Cell Biol* **99** (1984) 2165–2174.
43. D. K. Cheerambathur, G. Civelekoglu-Scholey, I. Brust-Mascher, P. Sommi, A. Mogilner, J. M. Scholey, *J Cell Biol* **177(6)** (2007) 994–1004.
44. Z. Lansky, M. Braun, A. Ludecke, P. R. ten Wolde, M. E. Janson, S. Diez, *Cell* **160(6)** (2015) 1159-1168.
45. R. Swaminathan, C. P. Hoang, A. S. Verkman, *Biophys J* **16** (1972) 1900-1907.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Martina Manenica

Datum rođenja: 02. kolovoza 1996.

Mjesto rođenja: Metković, Hrvatska

Obrazovanje

2003.–2011. Osnovna škola don Mihovila Pavlinovića, Metković

2011.–2015. Gimnazija Metković, Metković

2015.–2018. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2019. Rektorova nagrada za individualni znanstveni rad pod naslovom *Nukleacija novih svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu putem proteinskog kompleksa augmina*

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019.- Voditeljica i autorica znanstvene emisije *Treći element* na trećem programu HRT-a

2016.-2019. Otvoreni dan kemije (Dan i noć na PMF-u)

2017.-2019. Voditeljica studentskog volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*

2017.-2019. Supervizorica studentskog volonterskog projekta *BASF Kids' Lab- Malci genijalci*

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. M. Manenica, J. Simunić, I. M. Tolić, *Utišavanje proteinskog kompleksa augmina ključnog za grananje mikrotubula u diobenom vretenu*, 5. Simpozij studenata kemičara, 27. listopada 2018., Zagreb, Hrvatska

2. J. Simunić, **M. Manenica**, J. Matković, I. M. Tolić, *Formation of microtubule bundles during prometaphase*, Mitotic spindle: From living and synthetic systems to theory, 24.-27. ožujka 2019., Split, Hrvatska
3. **M. Manenica**, J. Simunić, I. M. Tolić, *Formiranje svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu: uloga augmina i PRC1*, 6. Simpozij studenata kemičara, 26. listopada 2019., Zagreb, Hrvatska
4. **M. Manenica**, I. Koprivec, V. Štimac, J. Simunić, I. M. Tolić, *Augmin-dependent microtubule branching enables nucleation of bridging fibers in mitotic spindle*, EMBO | EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems, 3.-6. lipnja 2020., EMBL Heidelberg, Njemačka