



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Martina Manenica

**Nukleacija novih svežnjeva mikrotubula u  
diobenom vretenu putem proteinskog  
kompleksa augmina**

Zagreb, 2019.



Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biofiziku stanice Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom prof. dr. sc. Ive Tolić i dr. sc. Juraja Simunića, te mentorstvom doc. dr. sc. Morane Dulić, sa Zavoda za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta Europskog istraživačkog vijeća (ERC) pod nazivom *NewSpindleForce* (647077).

## POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

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

CENP-A – centromerni protein A (eng. *centromere protein A*)

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

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

HAUS6 – podjedinica proteinskog kompleksa augmina (eng. *HAUS augmin like complex subunit 6*)

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

SiR-Tubulin – boja za tubulin na bazi silikon-rodamina

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....</b>  | <b>IV</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>2.1. Stanična dioba .....</b>  | <b>2</b>  |
| 2.1.1. Stanični ciklus .....  | 2         |
| 2.1.2. Glavne podfaze M faze u eukariotskoj stanici.....  | 3         |
| 2.1.3. Diobeno vreteno.....   | 5         |
| 2.1.4. Protein regulator citokineze 1.....  | 8         |
| 2.1.5. Nastajanje diobenog vretena i važnost proteinskog kompleksa augmina.....   | 10        |
| <b>2.2. Proučavanje funkcije i lokalizacije proteina u živom sustavu .....</b>  | <b>12</b> |
| 2.2.1. Stanične linije.....   | 12        |
| 2.2.2. RNAi kao metoda ciljnog utišavanja ekspresije proteina .....   | 12        |
| 2.2.3. Kvantitativna fluorescencijska mikroskopija .....  | 13        |
| 2.2.4. Fluorescentni proteini i imunocitokemija .....   | 14        |
| <b>§ 3. MATERIJALI I METODE.....</b>  | <b>16</b> |
| 3.1.1. Uzgoj stanica.....   | 16        |
| 3.1.2. Priprema uzorka za mikroskopiranje.....  | 17        |
| 3.1.3. Transfekcija stanica sa siRNA .....  | 17        |
| 3.1.4. Imunocitokemija.....   | 18        |
| <b>3.2. Mikroskopiranje.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>3.3. Analiza snimaka .....</b>   | <b>21</b> |
| 3.3.1. Analiza intenziteta signala HAUS6.....   | 21        |
| 3.3.2. Transformacija horizontalnog prikaza vretena u vertikalni prikaz .....   | 22        |
| 3.3.3. Analiza vertikalnog prikaza vretena .....  | 23        |
| 3.3.4. Kvantifikacija raspodjele mikrotubula u poprečnom presjeku vertikalnog vretena .....                               | 24        |
| 3.3.5. Analiza horizontalnog prikaza vretena .....  | 25        |
| 3.3.6. Statistička analiza podataka .....   | 26        |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>4.1. Utišavanje ekspresije augmina u stanicama HeLa divljeg tipa .....</b>   | <b>27</b> |
| 4.1.1. Utišavanje ekspresije augmina značajno utječe na fenotip vretena.....  | 27        |
| 4.1.2. Transformacija horizontalnog prikaza u vertikalni prikaz omogućuje detaljnije proučavanje arhitekture vretena..... | 29        |

---

|   |              |
|---|--------------|
| 4.1.3. Utišavanje ekspresije augmina potencijalno utječe na duljinu antiparalelnog preklopa.....  | 31           |
| <b>4.2. Utišavanje ekspresije augmina u stanicama HeLa PRC1 GFP .....</b>   | <b>32</b>    |
| 4.2.1. Žive stanice u odnosu na fiksirane pokazuju drastičniji fenotip u formiranju diobenog vretena kada im je onemogućena ekspresija augmina..... | 32           |
| 4.2.2. Diobena vretena koja se formiraju u nedostatku augmina su šira i duža, a u poprečnom presjeku nema svežnjeva mikrotubula.....                | 35           |
| 4.2.3. Kompleks augmin potencijalno doprinosi nukleaciji premošćujućih vlakana.....   | 39           |
| <b>4.3. Utišavanje ekspresije augmina u stanicama HeLa centrin1-EGFP CENP-A-EGFP .....</b>  | <b>43</b>    |
| 4.3.1. Utišavanje ekspresije augmina u stanicama HeLa centrin1-EGFP CENP-A-EGFP daje konzistentne rezultate.....                                    | 43           |
| 4.3.2. Nukleacija mikrotubula posredovana augminom jedan je od mehanizama nastanka premošćujućih vlakana u diobenom vretenu.....                    | 48           |
| <b>4.4. Dinamika nastanka diobenog vretena u prometafazi u ovisnosti o augminu .....</b>  | <b>52</b>    |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>59</b>    |
| <b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>   | <b>60</b>    |
| <b>SAŽETAK.....</b>   | <b>XVI</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>XVIII</b> |
| <b>§ 7. ŽIVOTOPIS .....</b>   | <b>XXI</b>   |

---

## § 1. UVOD

Stanična dioba dio je staničnog ciklusa u kojem iz roditeljske stanice nastaju dvije stanice kćeri, a pravilnu raspodjelu kromosoma osigurava diobeno vreteno. Diobeno vreteno formira se nakon raspadanja jezgrine ovojnice u profazi tako što se mikrotubuli povezuju s kromosomima pomoću proteinskih pričvrsnica-kinetohora. Sestrinske kinetohore se povezuju sa svežnjevima mikrotubula koji nastaju iz suprotnih polova diobenog vretena. Do iduće faze mitoze, metafaze, svi parovi sestrinskih kinetohora vezani su na opisani način, a to je ključno kako bi došlo do pravilne diobe kromosoma.

Sam mehanizam nastanka diobenog vretena nije do kraja poznat. Poznato je da mikrotubuli mogu nastati iz centrosoma koji se nalaze u polovima vretena, kao i putem mehanizama neovisnih o centrosomu. Do sada su istraženi mehanizam ovisan o kromatinu i mehanizam nastanka novih mikrotubula na već postojećima posredovanjem proteinskog kompleksa augmina.

Za ispitivanje funkcije i doprinosa određenih proteina moguće je ciljno utišati njihovu ekspresiju korištenjem interferirajuće RNA, male molekule koja sprječava translaciju proteina od interesa. Efekti na stanicu iz kojih se potom objašnjava funkcija proteina proučavaju se najčešće fluorescencijskom mikroskopijom. Pritom je potrebno imati fluorescentno obilježene proteine na kojima bi se trebao vidjeti efekt.

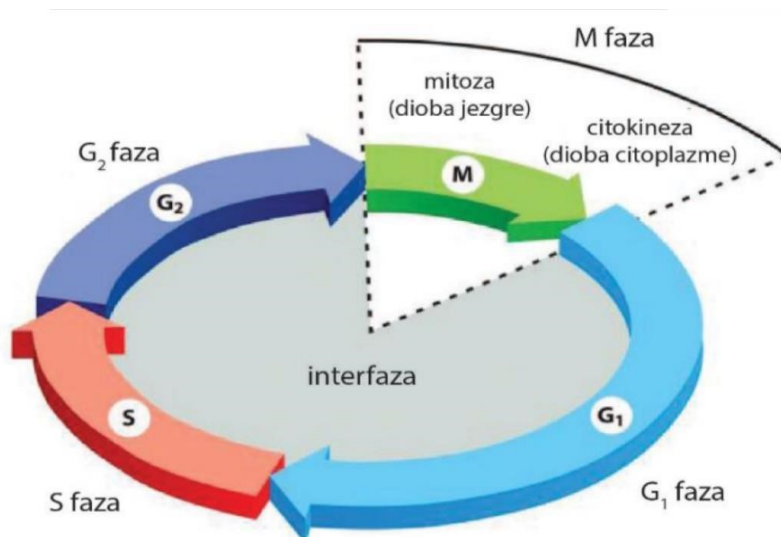
Cilj ovog rada bio je specifičnim utišavanjem translacije podjedinice HAUS6 proteinskog kompleksa augmina spriječiti njegovu ekspresiju u humanim tumorskim stanicama i ispitati utjecaje na formiranje diobenog vretena u ranoj mitozu. Pritom su korištene stanice HeLa, a protein od interesa koji je bio fluorescentno obilježen kako bi se zapazili efekti utišavanja ekspresije bio je protein regulator citokineze 1 (PRC1). PRC1 sudjeluje u stvaranju i održavanju svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Stanična dioba

#### 2.1.1. Stanični ciklus

Stanična dioba je proces kojim se jedna eukariotska stanica dijeli na dvije nove stanice. Ključni je dio staničnog ciklusa koji se dijeli na četiri faze: G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub> fazu koje zajedno čine interfazu, te M fazu (slika 1). U većini stanica postoje dvije G (eng. *gap*) faze koje razdvajaju događaje koji se odvijaju u S i M fazama. G<sub>1</sub> faza je karakterizirana biosintezom proteina i mRNA, te rastom stanice. Glavne promjene koje karakteriziraju interfazu događaju se u S fazi; tada se udvostručuje DNA kako bi obje stanice kćeri dobile istovjetan genetski materijal. U G<sub>2</sub> 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 G<sub>2</sub> faze, započinje mitozu ili M faza (eng. *mitosis*) 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.<sup>1</sup>



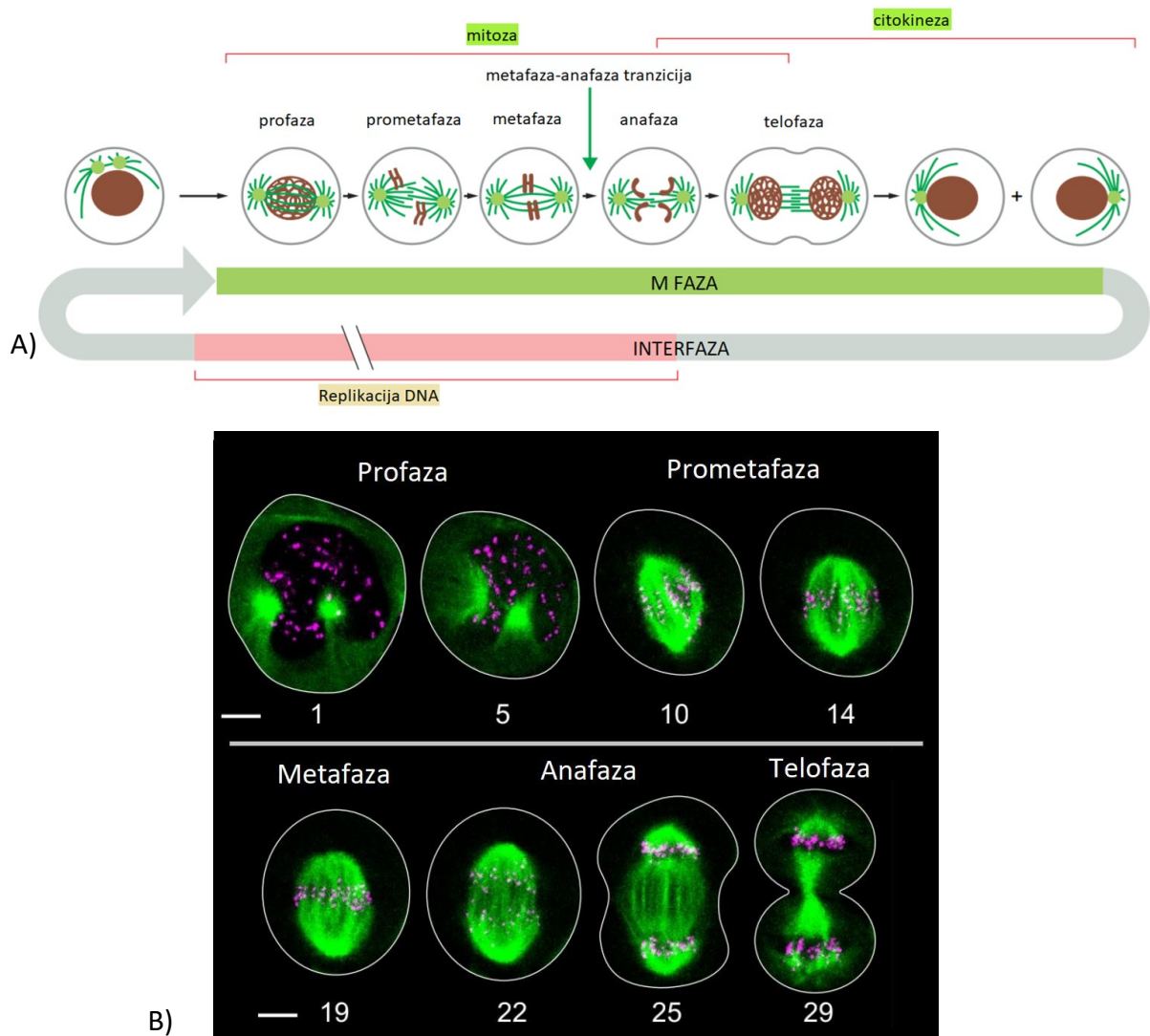
**Slika 1. Grafički prikaz staničnog ciklusa.** Gap-faze, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>, te faza sinteze S čine interfazu. U fazi M događa se mitozu (dioba jezgre) i citokinezu (podjela citoplazme i organela). Preuzeto i obrađeno prema ref. 1



### 2.1.2. Glavne podfaze M faze u eukariotskoj stanici

Na samom početku diobe, u **profazi**, sestrinske kromatide koje čine kromosom kondenziraju, a van jezgre formira se diobeno vreteno, stanična struktura građena od polimera  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulina. Diobeno vreteno nastaje između dva centrosoma. Svaki centrosom građen je od dvaju centriola koja stoje jedna na prema drugoj pod pravim kutom, te pericentriolarne tvari, a u stanici ima ulogu glavnog organizacijskog središta mikrotubula (eng. *microtubule organizing center*, MTOC) (slika 2).

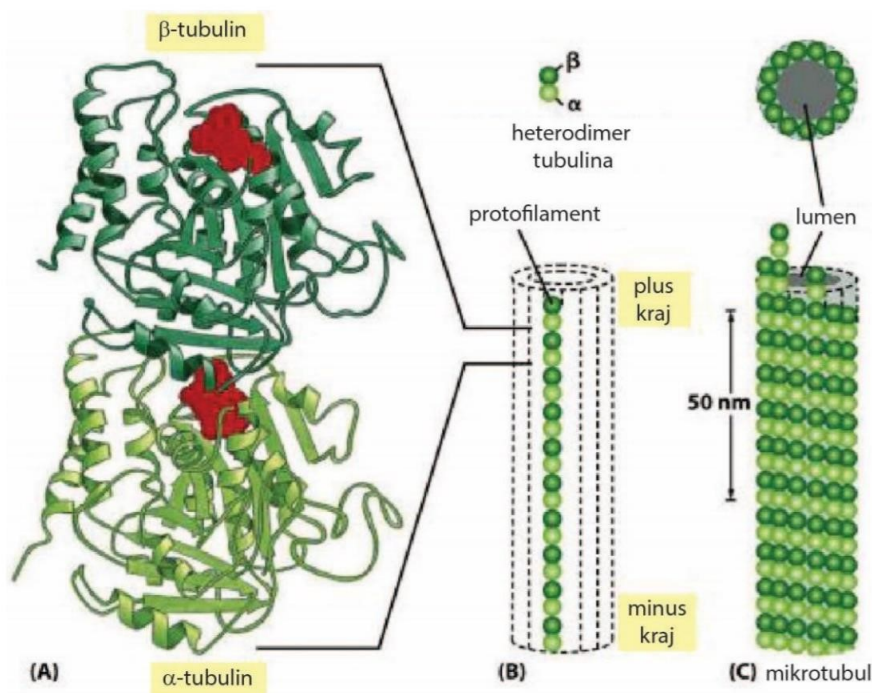
U **prometafazi** koja slijedi, dolazi do raspada jezgrine ovojnice. Kromosomi se sada mogu vezati na mikrotubule pomoću proteinskih pričvrsnica-kinetohora. Da bi mitozu bila uspješna, sestrinske kromatide moraju se vezati na suprotne polove, tj. mora nastati bipolarno vreteno. Za pravilnu orijentaciju ključne su sile u vretenu koje kinetohore mogu 'osjetiti' i time se centrirati u središte vretena. Sam proces centriranja izrazito je dinamičan, pri čemu mikrotubuli asociraju i disociraju s kinetohora. Potrebno je neko vrijeme dok se kromosomi ne poslože u središte, tj. dok se ne uspostavi **metafaza** kada su kromosomi posloženi u ekvatorijalnu ravninu vretena. Odvajanje kromosoma slijedi u **anafazi**. 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. Kada se kromatide približe polovima u **telofazi**, dolazi do disocijacije vretena i ponovnog stvaranja nuklearne ovojnice oko svake jezgre te dekonenzacije kromatina. Time završava mitozu. 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.<sup>1</sup>



**Slika 2. Ključni događaji diobe eukariotske stanice.** A) Interfaza u kojoj se događa rast stanice, sinteza proteina i replikacija DNA traje duže od M faze. M faza dijeli se tradicionalno na mitozu i citokinezu, a mitozu na pet podfaza koje se mogu uočiti pod mikroskopom: profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu. Biokemijsko stanje stanice najznačajnije se mijenja na prijelazu iz metafaze u anafazu kada započinje odvajanje kromosoma. Pred kraj M faze započinje citokineza. Preuzeto i obrađeno prema ref. 1 B) Prikaz faza diobe na primjeru stanice U2OS sa stabilnom ekspresijom proteina CENP-A-GFP koji lokalizira na kinetohorama i mCherry- $\alpha$ -tubulina. Linija predstavlja 5  $\mu$ m, a vrijeme je dano u minutama. Preuzeto i obrađeno prema ref. 3

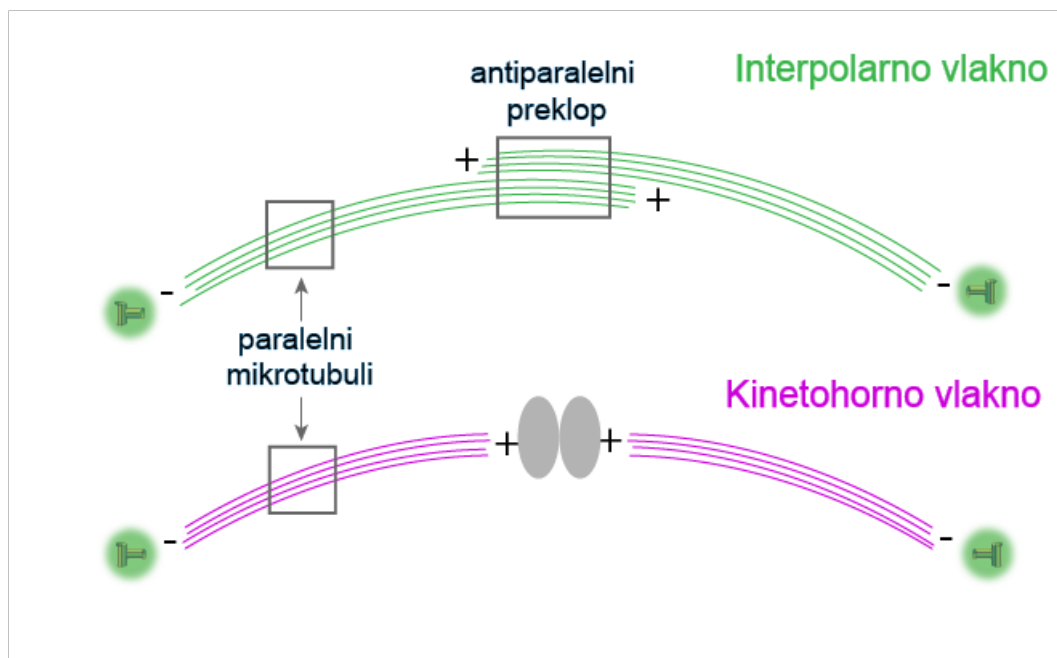
## 2.1.3. Diobeno vreteno

Diobeno vreteno građeno je od mikrotubula, proteinskih cjevčica koje nastaju polimerizacijom  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulina. Svaki mikrotubul građen je od 13 protofilamenata koji su lateralno povezani, te čine šuplju cilindričnu strukturu. Protofilamenti na jednom kraju imaju  $\beta$ -tubulin koji se naziva (+) kraj, a na drugom kraju  $\alpha$ -tubulin nazvan (-) kraj (slika 3).<sup>1,2</sup> 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.  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulin imaju vezno mjesto za GTP. Kada si dimer GTP- $\alpha$ - i GTP- $\beta$ -tubulina veže na mikrotubul, nakon nekog vremena dolazi do hidrolize GTP-a u GDP u  $\beta$ -tubulinu, dok u  $\alpha$ -tubulinu ne dolazi do hidrolize za vrijeme trajanja procesa. Dimer s GDP- $\beta$ -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.<sup>1</sup>



**Slika 3. Građa mikrotubula.** A) Heterodimer koji gradi protofilament građen je od  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulina, globularnih proteina koji vežu GTP (crveno). B) Protofilament mikrotubula ima usmjerenje: na minus (-) kraju nalazi se  $\alpha$ -tubulin, a na plus (+) kraju  $\beta$ -tubulin. C) Trinaest lateralno vezanih protofilamenata čini mikrotubul. Preuzeto i obrađeno prema ref. 1

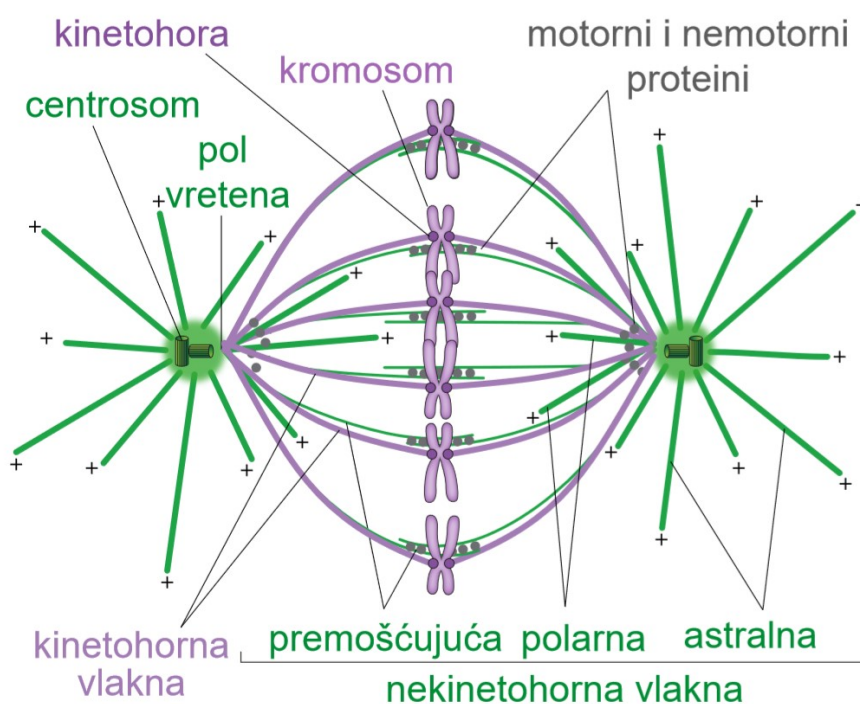
U bipolarnom vretenu (-) krajevi mikrotubula nalaze se većinom u polu, a (+) krajevi idu od pola prema središtu vretena ili prema staničnoj membrani. Mikrotubuli se međusobno vežu u svežnjeve i oni koji potječu s istog pola nazivaju se paralelni. Oni imaju istu orijentaciju, tj. svim mikrotubulima će (-) kraj biti na istom polu, a (+) kraj u središtu vretena. Mikrotubuli koji potječu od suprotnih polova u središtu vretena integriraju u antiparalelni preklop (slika 4).<sup>1,2,5</sup>



**Slika 4. Svežnjevi prema usmjerenju.** Interpolarna vlakna građena su od mikrotubula koji rastu s istog pola i imaju isto 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. Priređeno prema ref. 1,2,5

Ovisno o orijentaciji, svežnjevi mikrotubula mogu imati različite uloge u vretenu. Najvažniji i najstabilniji paralelni svežnjevi mikrotubula u diobenom vretenu su kinetohorna vlakna (k-vlakna) koja se svojim (+) krajem vežu na kinetohore. Uz k-vlakna, u diobenom vretenu nalaze se još dvije klase mikrotubula – interpolarni i astralni mikrotubuli. Stabilni antiparalelni preklopi u središtu vretena tvore interpolarna vlakna.<sup>2</sup> Astralni mikrotubuli prostiru se iz polova diobenog vretena u citoplazmu te kroz interakciju sa staničnom korteksom sudjeluju u pozicioniranju vretena u stanici. Posljednjih godina dokazano je postojanje još jedne vrste interpolarnih mikrotubula u animalnim stanicama koji se nalaze u blizini sestrinskih kinetohora i tvore strukturu koja podsjeća na most stoga su nazvani premošćujući ili premosni mikrotubuli (eng. *bridging microtubules*), a vlakna koja tvore su premošćujuća vlakna.<sup>2-4</sup> Ista vlakna prethodno

su uočena i elektronskom mikroskopijom, a pokazano je da su građena od antiparalernih mikrotubula.<sup>2,5,6</sup> Da postoji direktna poveznica između premošćujućih mikrotubula te sestrinskih kinetohora i kinetohornih vlakana pokazano je laserskom ablacijom, postupkom zarezivanja kinetohornog vlakna. Nakon zarezivanja došlo je do zajedničkog kretanja premošćujućeg vlakna, svežnja mikrotubula koji nije ablatiran, sestrinskih kinetohora i dijela ablatiranog kinetohornog vlakna. Time je dokazano da je riječ o jedinstvenom elementu diobenog vretena čija je pravilna struktura nužna za funkciju diobenog vretena.<sup>4,7</sup>

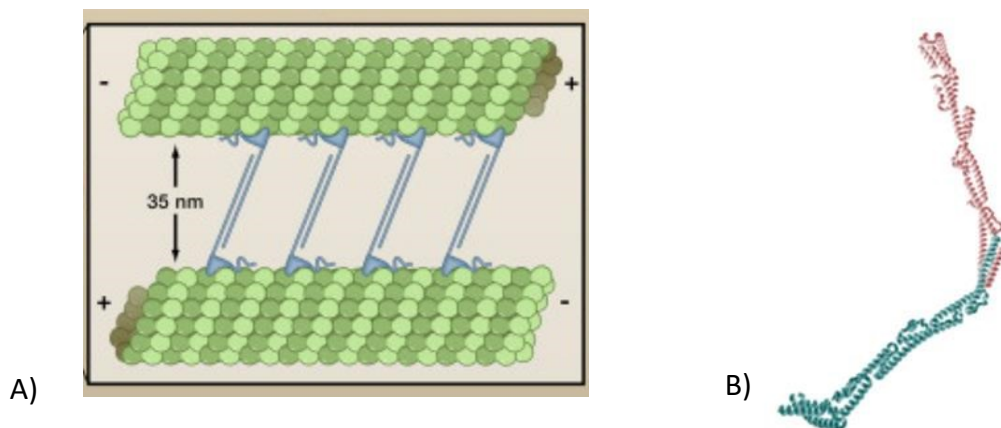


**Slika 5. Prikaz diobenog vretena s označenim osnovnim dijelovima.** Diobeno vreteno izgrađeno je od astralnih, kinetohornih i interpolarnih mikrotubula. Interpolarna vlakna mogu se lateralno vezati na kinetohore i tada tvore premošćujuća vlakna. Osnovni dijelovi diobenog vretena su i centrosomi, motorni i nemotorni proteini te kinetohore. Preuzeto i obrađeno prema ref. 3 i 11

Osim mikrotubula, diobeno vreteno grade i reguliraju brojni drugi proteini (eng. *microtubule associated proteins, MAPs*) koji se mogu podijeliti u 4 skupine. Prvu skupinu čine motorni proteini koji pretvaraju kemijsku energiju 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 (eng. *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 (eng. *passive crosslinking proteins*).<sup>1,3</sup>

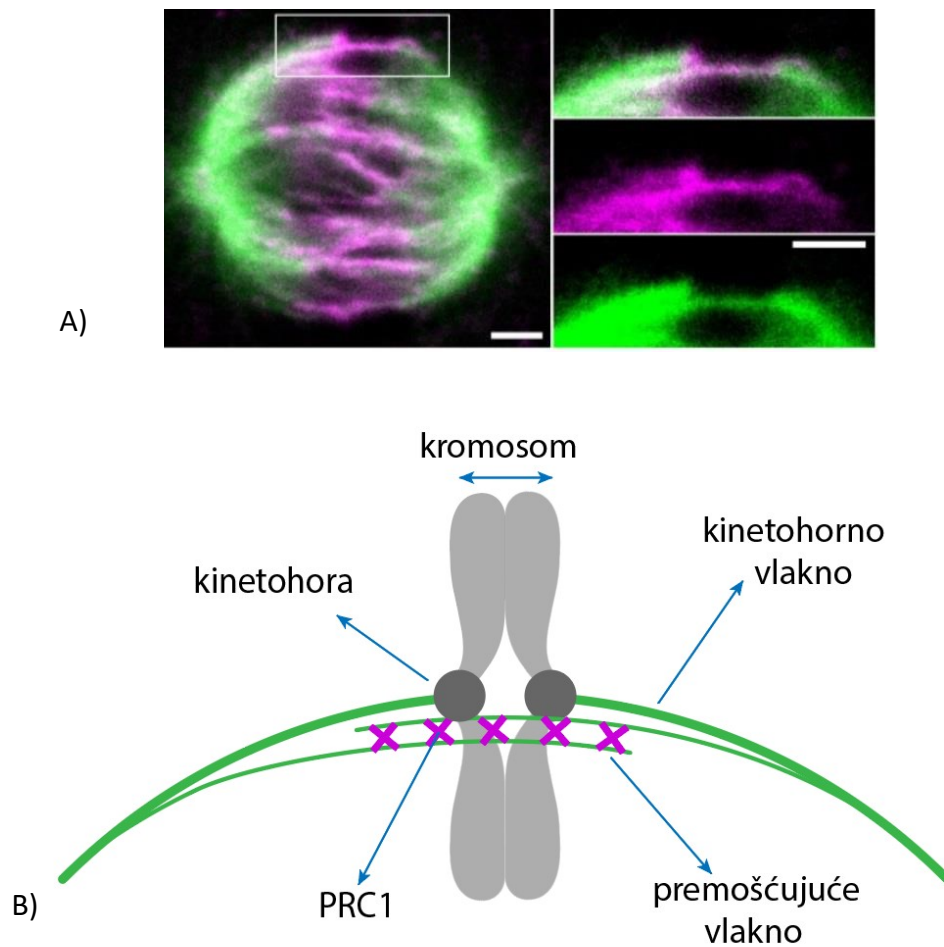
#### 2.1.4. Protein regulator citokineze 1

Protein regulator citokineze 1 (PRC1, eng. *Protein Regulator of cytokinesis 1*) ljudski je protein kojeg kodira gen *PRC1* i važan je za diobu ljudskih stanica. U interfazi je lokaliziran u jezgri, u metafazi se nalazi na diobenom vretenu, a u citokinezi je lokaliziran na središnjem tijelu (eng. *spindle midbody*) vretena. Otkriven je 1998. godine kada su ispitivani supstrati ciklin-ovisnih kinaza. Glavna uloga PRC1 je povezivanje antiparalelnih svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu bez da se pritom kreće po mikrotubulima, te time pripada u četvrtu skupinu proteina MAP (slika 6).<sup>8,9</sup>



**Slika 6. Protein regulator citokineze 1.** A) PRC1 u aktivnom stanju je homodimer (plavo) koji povezuje dva mikrotubula suprotnog usmjerenja (zeleno). Preuzeto i obrađeno prema ref. 8 B) Kristalna struktura PRC1. PRC1 je homodimer (pojedini lanci-plavo i zeleno). Preuzeto i obrađeno prema ref. 9

Upravo činjenica da PRC1 specifično veže preklapajuće dijelove antiparalelnih mikrotubula *in vitro*<sup>10</sup> i u diobenom vretenu<sup>11,12</sup> omogućila je proučavanje premošćujućih vlakana čime je dodatno objašnjena njihova uloga.

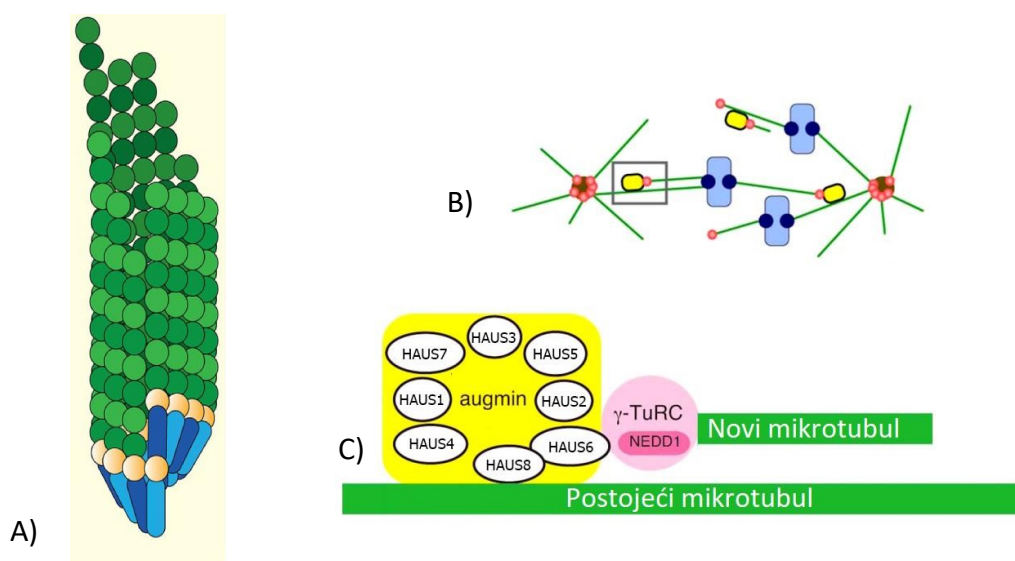


**Slika 7. Diobeno vreteno i premošćujuća vlakna.** A) Vreteno u stanici HeLa. Mikrotubuli su prikazani zelenom (tubulin-GFP), a PRC1 ljubičastom bojom. Premošćujuće vlakno vidljivo je između dva kinetohorna vlakna. Skala je 1  $\mu\text{m}$ . Preuzeto i obrađeno prema ref. 11 B) Shematski prikaz vretena s naznačenim premošćujućim vlaknom i PRC1. Preuzeto i obrađeno prema ref. 48

## 2.1.5. Nastajanje diobenog vretena i važnost proteinskog kompleksa augmina

Kako se točno formiraju mikrotubuli u prometafazi kako bi dali prepoznatljivi izgled i funkciju diobenog vretena još uvijek je veliko znanstveno pitanje. Poznato je više mehanizama nukleacije mikrotubula, a svi uključuju  $\gamma$ -tubulinski prstenasti kompleks (eng.  *$\gamma$ -tubulin ring complex*,  $\gamma$ -TuRC) kao kalup za nukleaciju<sup>14,22</sup>. Najbolje istražen mehanizam je 'Search-and-capture'<sup>13</sup> u kojem novi mikrotubuli nukleiraju na polu vretena i rastu prema središtu, te se stabiliziraju vezanjem na kinetohoru. Otkriveni su i mehanizmi u kojima mikrotubuli mogu rasti i od kinetohora prema polu<sup>14</sup>, kao i da mogu rasti iz postojećih mikrotubula.<sup>15-21</sup> Ključna komponenta koja omogućuje rast novih mikrotubula iz već postojećih na način da veže  $\gamma$ -TuRC je proteinski kompleks augmin (slika 8).

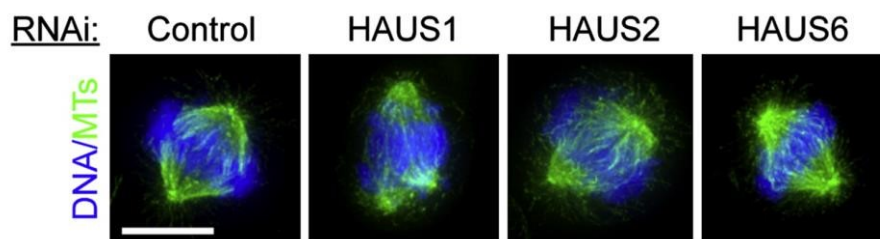
Augmin je prvotno otkriven u modelnom organizmu *Drosophila melanogaster* kao kompleks od 5 proteina redom nazvanih Dgt 2-6. Budući da kompleks omogućuje povećanje broja mikrotubula, nazvan je augmin prema latinskoj riječi *augmentare* što znači povećavati.<sup>15</sup> Otkriven je i ljudski homolog koji je kompleks od 8 proteina redom nazvanih HAUS1-8.<sup>15-18</sup>



**Slika 8. Nukleacija novih mikrotubula putem augmin kompleksa.** A) Novi mikrotubul (zeleno) raste na kompleksu  $\gamma$ -TuRC (plavo) koji mu služi kao kalup. Preuzeto i obrađeno prema ref. 22 B) Model nastanka diobenog vretena. Kompleks augmina omogućuje vezanje  $\gamma$ -TuRC-a na postojeći mikrotubul. Augmin-žuto,  $\gamma$ -TuRC-ružičasto, kromosom i kinetohore-plavo, mikrotubuli-zeleno. C) Pretpostavljeni izgled kompleksa augmina. HAUS6 vezan je preko NEDD1 na  $\gamma$ -TuRC, a HAUS8 na postojeći mikrotubul. Preuzeto i obrađeno prema ref. 17



Utišavanje ekspresije augmina pomoću transfekcije stanica interferirajućom RNA (odjeljak 2.2.1.) uzrokovalo je manji intenzitet signala mikrotubula u središnjem dijelu vretena, te je zaključeno da je došlo do smanjenja broja mikrotubula u vretenu. Također, pritom je produljeno vrijeme potrebno za pravilo slaganje kromosoma u metafaznu ravninu i došlo je do redukcije kinetohornih vlakana.<sup>15-17</sup> Značajan je i bio porast broja multipolarnih vretena.<sup>16</sup> Navedeni efekti dogode se s gotovo istom učestalošću neovisno o tome koja je podjedinica kompleksa utišana.<sup>15-17</sup>



**Slika 9. Utišavanje ekspresije augmina pomoću interferirajuće RNA.** Posljedično dolazi do abnormalnosti u formiranju vretena. DNA je obilježena plavom bojom, a mikrotubuli zelenom. Preuzeto i obrađeno prema ref. 16

Pokazano je da novi mikrotubuli koji nastaju zahvaljujući augminu rastu pod kutem do  $30^\circ$  u odnosu na postojeći mikrotubul, te se takav proces naziva grananjem novih mikrotubula.<sup>18,19</sup> Time se omogućuje porast broja mikrotubula u središtu vretena u blizini kinetohora i povećava vjerojatnost da mikrotubuli uhvate kinetohore za vrijeme formacije vretena.<sup>23</sup>

## 2.2. Proučavanje funkcije i lokalizacije proteina u živom sustavu

### 2.2.1. Stanične linije

Za istraživanje funkcije proteina u njihovom prirodnom okružju, 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 dioba<sup>1</sup>. Budući da je riječ o tumorskim stanicama koje se mogu dijeliti i kada nije zadovoljena kontrolna točka, takve stanice s vremenom postaju mutipolarne i imaju značajno više kromosoma od netumorskih stanica<sup>9</sup>, što treba uzeti u obzir prilikom tumačenja rezultata dobivenih u istraživanju.

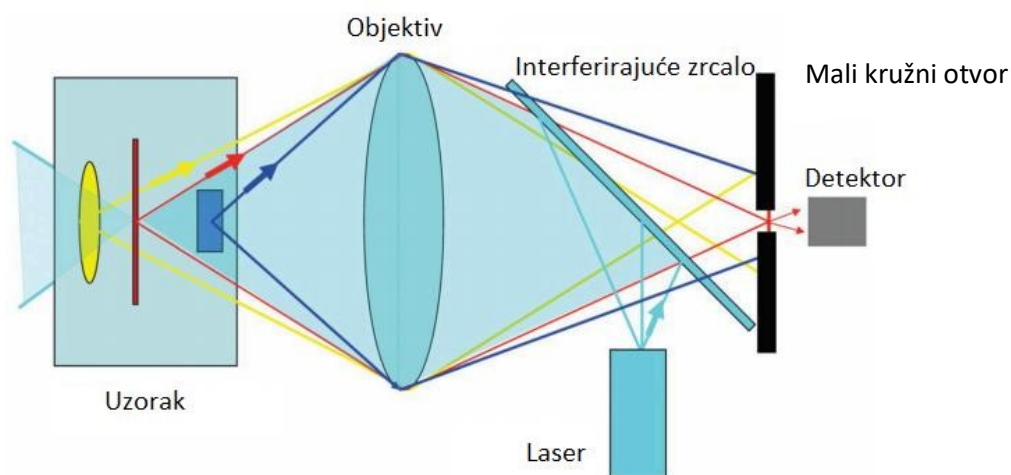
### 2.2.2. RNAi kao metoda ciljnog utišavanja ekspresije proteina

Jedna od najčešće korištenih metoda za proučavanje funkcije proteina u staničnoj biokemiji je metoda RNA interferencije (RNAi) za ciljno utišavanje ekspresije proteina. Riječ o maloj interferirajućoj molekuli RNA (eng. *small interfering RNA*, siRNA) koja hibridizira s mRNA i time sprječava translaciju s takve mRNA. Sam mehanizam otkriven je 1998. godine u obliku *Caenorhabditis elegans* i od tada se koristi kao rutinska metoda.<sup>24,25</sup> Usporedbom fenotipa stanica koje su bile izložene siRNA koja utišava protein od interesa i kontrolnih stanica, moguće je pretpostaviti funkciju proteina.<sup>26</sup> Upotreba metode RNA interferencije dovela je do brojnih značajnih otkrića i za istu je 2006. dodijeljena Nobelova nagrada.<sup>27</sup>

U stanice je potrebno unijeti siRNA transfekcijom; riječ je o postupku unošenja pročišćenih nukleinskih kiselina u eukariotsku stanicu. Svaka eukariotska stanica omeđena je polupropusnom membranom i potrebno je kemijskim ili fizikalnim postupkom napraviti pore u membrani kroz koje može ući molekula RNA. Neki od načina su korištenje kalcijeva fosfata, elektroporacija (korištenje električnog polja) i sabijanjem stanica. Također, moguće je transfecirati stanice pomoću mješavine kationskog lipida i željene RNA. Pritom se stvaraju liposomi koji fuzioniraju s membranom i otpušta se teret u stanicu, stoga se metoda naziva lipofekcija.<sup>28</sup>

### 2.2.3. Kvantitativna fluorescencijska mikroskopija

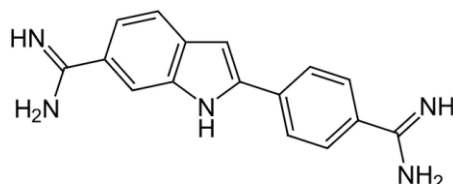
Fluorescencijska mikroskopija omogućila je proučavanje živih sustava u visokoj rezoluciji, a time i dobivanje informacije o lokalizaciji i funkciji proteina od interesa u živoj stanici. Upravo takvim istraživanjima osobito je doprinijela laserska pretražna konfokalna mikroskopija (eng. *laser-scanning confocal microscopy*). U toj mikroskopiji izvor zračenja je laser što omogućuje fokusiranje svežnjeva svjetlosti i značajno manje raspršenje zračenja u odnosu na prije razvijenu mikroskopiju širokog polja (eng. *widefield microscopy*). To je postignuto pomoću malog kružnog otvora (eng. *pinhole aperture*) koja osigurava da svjetlo do detektora dolazi samo iz ekvivalentne (konfokalne) točke uzorka gdje je bio fokusiran ekscitacijski snop (slika 10). Na takav način slika se dobiva piksel po piksel i bilježi se intenzitet fluorescencije u svakoj točki. Laser i mali kružni otvor su nepomični, ali snop se usmjerava s pomoću oscilatornih zrcala. Serija slika dobivenih iz različitih dubina može poslužiti za rekonstrukciju trodimenzionalne strukture uzorka koji se ispituje.<sup>36</sup>



**Slika 10. Princip rada laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa.** Laserska zraka fokusira se na debljem uzorku refleksijom s interferencijskog zrcala i leća objektivna. Mali kružni otvor omogućuje prolazak snopa koji je došao s konfokalne ravnine na detektor. Preuzeto i obrađeno prema ref. 36

Slike su u fluorescencijskoj mikroskopiji dobivene detekcijom fotona emitiranih iz fluorescirajućih molekula u uzorku.<sup>29</sup> Većinom je riječ o molekulama koje su kovalentno povezane s proteinima od interesa, a ne o samim proteinima što je bitno uzeti u obzir kod kvantitativne analize. U kvantitativnoj analizi iz intenziteta signala dobiva se informacija o količini fluorescirajuće molekule. Ta informacija nije dovoljna da bi se govorilo o apsolutnoj količini proteina od interesa u stanici, ali je moguće usporediti intenzitet signala u stanicama koje su primjerice tretirane s siRNA i kontrolnim stanicama.<sup>30</sup>

Fluorescirajuće molekule-fluorofori koje se specifično vežu na molekule od interesa često se nazivaju 'boje'. Primjer malih molekula koje posjeduju intrinzično fluorescirajuće svojstvo i vežu se specifično na nukleinske kiseline su: DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (slika 11) i Hoechst boje (po sastavu bis-benzimidi).<sup>30</sup>



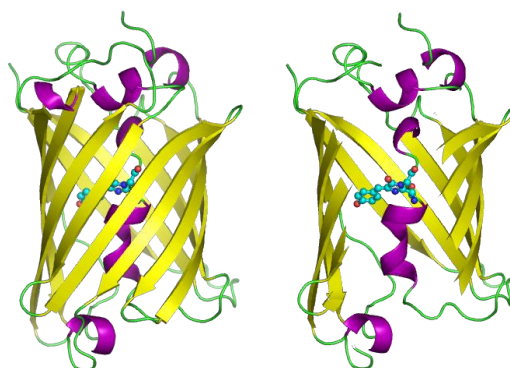
**Slika 11. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).** Preuzeto i obrađeno prema ref. 30

Drugi primjeri fluorofora su fluorescein, rodamin, cianin i sl. Danas su razvijeni brojni derivati tih spojeva koji se onda specifično vežu na nukleinske kiseline i proteine od interesa. Silikon-rodamin (SiR) vezan na bis-benzimid koji se specifično veže na manji utor DNA koristi se za obilježavanje kromosoma u živim stanicama. Posebnost SiR-a je u tome što može proći kroz membranu bez transfekcije, kao i to što stanica može biti živa i prolaziti kroz stanični ciklus.<sup>31</sup>

#### 2.2.4. Fluorescentni proteini i imunocitokemija

Otkriće fluorescentnih proteina omogućilo je specifično praćenje genske ekspresije u stanici. Gen za takve proteine s genom proteina od interesa i tako dobivena rekombinantna DNA unese se u stanicu. Ekspresijom rekombinantnih gena dolazi do sinteze fuzijskih proteina koji imaju fluorescencijsku oznaku. Takvim označavanjem moguće je pratiti njihovo kretanje i lokalizaciju u stanici pomoću fluorescencijske mikroskopije.<sup>32</sup>

Najpoznatiji fluorescentni protein je zeleni fluorescentni protein GFP (eng. *Green fluorescent protein*) koji je prvi put izoliran iz meduze *Aequorea victoria* i sastoji se od 238 aminokiselina (slika 12). Pobuđuje se svjetlošću valnih duljina koje odgovaraju plavom i ultraljubičastom dijelu spektra (ekscitacijski maksimumi na 395 nm i 475 nm), a fluorescira pri 509 nm što odgovara zelenom dijelu spektra.<sup>33</sup>



**Slika 12. Zeleni fluorescentni protein GFP.** Žutom je prikazana  $\beta$ -bačva s jedanaest  $\beta$ -vrpca, a ljubičastom  $\alpha$ -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. 33 i 34

S vremenom je otkriveno i sintetizirano sve više proteina s ovakvim svojstvom. Prednost njihova korištenja je u tome što je genetičkim inženjerstvom izazvana insercija nasljedna i što je moguće uzgajati stanične linije sa stabilnom ekspresijom fluorescentnih proteina s proteinima od interesa. Sami fluorescentni proteini ne utječu na biološke procese, ali treba biti oprezan prilikom konstrukcije gena kako bi protein od interesa nakon ekspresije zadržao svoju primarnu funkciju.<sup>32</sup>

Budući da je konstrukcija soja sa stabilnom ekspresijom dugotrajan postupak, ako je potrebno samo lokalizirati proteine, a ne promatrati njihovu funkciju u realnom vremenu, često se primjenjuje i metoda imunocitokemije. Za provođenje ove metode potrebno je je fiksirati stanice kako bi se proteini, a time i stanične strukture zadržali na mjestu. Takve stanice nakon fiksacije više nisu žive. Kao fiksativi se koriste koncentrirani alkoholi (npr. metanol) koji dehidriraju cijeli uzorak ili fiksativi na bazi aldehida (npr. glutaraldehid) koji umrežavaju proteine.<sup>35</sup>

Metoda imunocitokemije se bazira na tome što se specifično primarno antitijelo veže na protein od interesa. Potom se uzorak inkubira u otopini sekundarnog antitijela koje na sebi ima fluorofor i specifično se veže na primarno antitijelo. Kako bi se pratili intracelularni procesi potrebno je prenijeti antitijela kroz staničnu membranu. To se postiže korištenjem deterdženata (npr. Triton X-100 ili Tween-20) koji permeabiliziraju membranu.

## § 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1.1. Uzgoj stanica

Za provođenje eksperimenta korištene su ljudske tumorske stanične linije: HeLa divljeg tipa (u daljnjem tekstu: **HeLa dt**), HeLa sa stabilnom ekspresijom kinetohornog proteina CENP-A i centrina koji lokalizira na centrosomu obilježenih poboljšanim zelenim fluorescentnim proteinom (eng. *enhanced GFP*) (u daljnjem tekstu: **HeLa Centrin1-EGFP CENP-A-EGFP**), te HeLa-Kyoto BAC sa stabilnom ekspresijom proteina PRC1 obilježenog zelenim fluorescentnim proteinom (u daljnjem tekstu: **HeLa PRC1-GFP**).

Stanice su rasle u DMEM mediju (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Bazel, Švicarska) u koji je dodano 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a (eng. *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 % CO<sub>2</sub> 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 (eng. *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% CO<sub>2</sub>.

Sastav PBS pufera (1%):

8,0 g/L NaCl

0,2 g/L KCl

1,42 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

---

### 3.1.2. Priprema uzorka za mikroskopiranje

Uz prethodno opisani postupak presađivanja stanica potrebno je pripremiti uzorke za mikroskopiranje. Nakon što je neutralizirano djelovanje tripsina dodatkom 2 mL DMEM medija sa suplementima, određeni volumen medija sa stanicama (100 - 200  $\mu$ L, ovisno o konfluentnosti) dodan je u posudice za mikroskopiranje. U posudice je prethodno dodano 2 mL medija za uzgoj stanica. Posudice za mikroskopiranje su plastične, a na dnu se nalazi staklo promjera 35 mm i debljine 1,5 mm (MatTek Corporation, Ashland, SAD). Pripremljene stanice se čuvaju u inkubatoru pri 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.1.3. Transfekcija stanica sa siRNA

Pripremljena je siRNA za HAUS6 (L-018372-01-0005, Dharmacon, Lafayette, CO, SAD.) i kontrolna siRNA *Non-targeting Pool* (D-001910-10-05, Dharmacon, Lafayette, CO, SAD) prema uputama proizvođača. 250  $\mu$ L pufera komercijalnog naziva *1 x siRNA Buffer* (dobiven razrijeđenjem *5x siRNA Buffer*, (B-002000-UB-100, Dharmacon) u *RNAase free water*, (B-003000-WB-100, Dharmacon)) dodano je na liofilizat siRNA množine 5,0 nm. Dobivena otopina  $c = 20 \mu\text{mol} / \text{L}$  pohranjena je na -20 °C.

Nakon 24 sata stanice je moguće transfecirati prema protokolu za lipofekciju predloženom od proizvođača *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol 2013*. Po jednom uzorku bilo je potrebno pripremiti dvije otopine: prvu otopinu dodatkom 9  $\mu$ L lipofektamina *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent* u 150  $\mu$ L medija *Opti-MEM® Medium*, te drugu otopinu dodatkom 3  $\mu$ L siRNA ( $c = 20 \mu\text{mol} / \text{L}$ ) u 150  $\mu$ L medija *Opti-MEM® Medium*. Potom je pomiješano 150  $\mu$ L svake otopine i inkubirano na 37 °C 5 minuta. 250  $\mu$ L tako dobivene otopine dodano je u 2 mL medija u posudicu s prethodno nasađenim stanicama. Stanice su pohranjene u inkubatoru pri 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> na 24h, te je ispran medij s lipofektaminom i dodano je 2 mL DMEM medija. Stanice su ponovno pohranjene u inkubator na 24h.

Za snimanje živih stanica dodane su SiR boje prije snimanja. Stanicama HeLa PRC1 GFP 15 minuta prije snimanja dodana je boja SiR-DNA (SC007, Spirochrome AG, Stein am Rhein, Švicarska ILLI Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, SAD). Direktno u 2 mL medija dodano je 0,2  $\mu$ L boje ( $c = 50 \mu\text{mol} / \text{L}$ ).

3.1.4. *Imunocitokemija*

Kako bi se odredila učinkovitost inhibicije sinteze endogenog proteina HAUS6 RNA interferencijom, provedeno je imunocitokemijsko bojanje antitijelima (tablica 1) koje omogućuje vizualizaciju endogenog proteina prisutnog u stanicama. Također, isti postupak primijenjen je za vizualizaciju PRC1 i  $\alpha$ -tubulina u stanicama koje nisu imale stabilnu ekspresiju.

**Tablica 1. Antitijela korištena u izradi rada.**

| Protein od interesa                | Antitijelo            | Proizvođač   | Razrjeđenje u puferu                           |        |
|------------------------------------|-----------------------|--|--|--------|
| <b>PRC1</b>                        | Primarno antitijelo   | Mouse sc-8356  | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD      | 1:100  |
|                                    | Sekundarno antitijelo | Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse antibody  | Abcam, Cambridge, UK                           | 1:1000 |
|                                    |                       | Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-mouse antibody  | Abcam, Cambridge, UK                           | 1:1000 |
|                                    |                       | Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-mouse antibody  | Abcam, Cambridge, UK                           | 1:1000 |
| <b>HAUS6</b>                       | Primarno antitijelo   | Rabbit ab-150806                                       | Abcam, Cambridge, UK                           | 1:250  |
|                                    | Sekundarno antitijelo | Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rabbit antibody | Abcam, Cambridge, UK                           | 1:500  |
| <b><math>\alpha</math>-tubulin</b> | Primarno antitijelo   | Rabbit T3526   | Sigma-Aldrich (Merck-KGaA), St. Louis, MO, SAD | 1:100  |
|                                    | Sekundarno antitijelo | Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rabbit antibody | Abcam, Cambridge, UK                           | 1:500  |

48 h nakon transfekcije stanice su fiksirane dodatkom 2 mL 99,9 % metanola direktno u medij na ledu u trajanju od 1 minute. Potom je medij ispran i dodano je još 2 mL metanola na stanice u trajanju od 2 minute. Metanol je zatim ispran s tri ispiranja s 1 mL PBS pufera uz lagano potresanje u trajanju od po 5 minuta.

Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela stanice su inkubirane u 1 mL blokirajućeg/permeabilizirajućeg pufera (PBS s 1% NGS i 0,5% Triton X-100). Inkubacija je provedena u trajanju od 30 min, uz lagano potresanje na 4 °C. Nakon inkubacije stanice su



isprane s 3 ispiranja PBS puferom te je dodano 250  $\mu$ L otopine primarnog antitijela specifičnog za pojedini protein (tablica 1). Uzorci su inkubirani uz lagano potresanje na 4 °C preko noći.

Sljedeći dan uzorci su isprani 3 puta s PBS puferom po 5 minuta i nakon toga inkubirani u sekundarnom antitijelu (tablica 1) 45 minuta. Nakon još tri ispiranja u PBS puferu uzorku je dodana SiR DNA ili otopina boje DAPI (30 minuta) i potom isprana tri puta u PBS puferu. Uzorak s fiksiranim stanicama je tada spreman za mikroskopiranje.

Radi lakše preglednosti u tablici 2 prikazane su sve snimljene stanice i način na koji su vizualizirani proteini od interesa.

**Tablica 2. Stanične linije korištene u izradi rada i način vizualiziranja molekule od interesa.**

| SVE STANICE                      |   | MOLEKULA OD INTERESA |                           |                    |           |                            |
|----------------------------------|---|----------------------|---------------------------|--------------------|-----------|----------------------------|
| Stanična linija                  | Stanje u kojem su vizualizirane stanice | HAUS6                | PRC1                      | tubulin            | DNA       | Kinetohore (CENP-A)        |
| HeLa dt                          | fiksacija                               | Alexa Fluor 594 nm   | Alexa Fluor 488 nm        | /                  | DAPI      | /                          |
| HeLa PRC1 - GFP                  | žive stanice                            | /                    | stabilna ekspresija - GFP | /                  | SiR - DNA | /                          |
|                                  | fiksacija                               | Alexa Fluor 594 nm   | stabilna ekspresija - GFP | /                  | SiR - DNA | /                          |
| HeLa centrin1-EGFP CENP-A - EGFP | fiksacija                               | /                    | Alexa Fluor 594 nm        | /                  | /         | stabilna ekspresija - EGFP |
|                                  | fiksacija                               | /                    | Alexa Fluor 647 nm        | Alexa Fluor 594 nm | DAPI      | stabilna ekspresija - EGFP |

### 3.2. Mikroskopiranje

Stanice su snimane s Bruker Opterra Multipoint Scanning konfokalnim mikroskopom (Bruker Nano Surfaces, Middleton, WI, SAD). Sustav je postavljen na Nikonov preokretni Ti-E mikroskop opremljen Nikonovim CFI Plan Apo VC  $\times 100 / 1,4$  uljnim objektivom (Nikon, Tokyo, Japan). Tijekom snimanja stanice su bile na 37 °C u Okolab Cage inkubatoru (Okolab, Pozzuoli, NA, Italija). Karakteristika laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa je točkasta izlazna apertura (eng. *pinhole*). Slike su uhvaćene s Evolve 512 Delta EMCCD kamerom (Photometrics, Tucson, AZ, SAD). Sustav je kontroliran sa softverom *Prairie View Imaging Software* (Bruker Nano Surfaces, Middleton, WI, SAD). Odabrane su pobudne laserske linije valnih duljina 488 nm, 561 nm i 640 nm za vizualiziranje redom boje DAPI, GFP molekula i SiR boje.

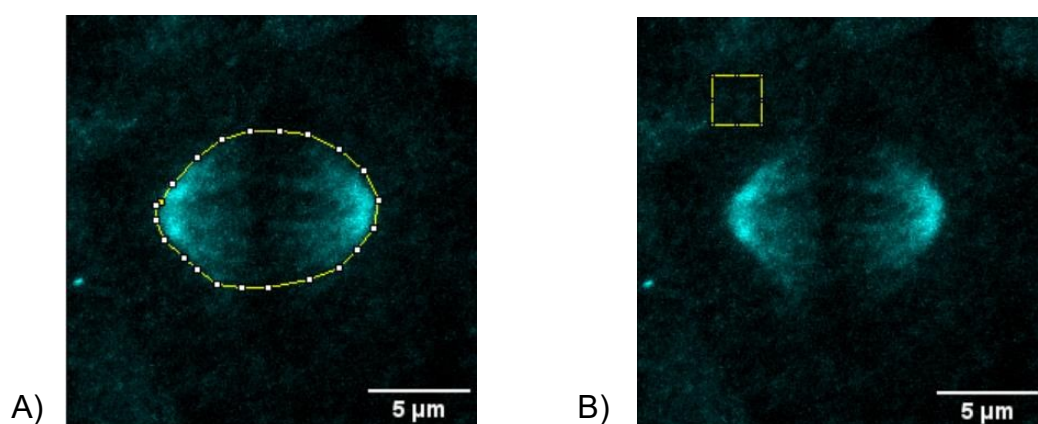
Laseri su podešeni na 30% jakosti uz vrijeme izlaganja jedne ravnine od 250 ms. Razmak između ravnina snimanja bio je 0,5  $\mu\text{m}$ , a snimljena je 41 ravnina za svaku stanicu. Za stanice koje su snimane od prometafaze do metafaze u vremenskom razmaku od 5 min laseri su bili podešeni na 20% jakosti uz vrijeme izlaganja jedne ravnine od 150 ms.

### 3.3. Analiza snimaka

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

#### 3.3.1. Analiza intenziteta signala HAUS6

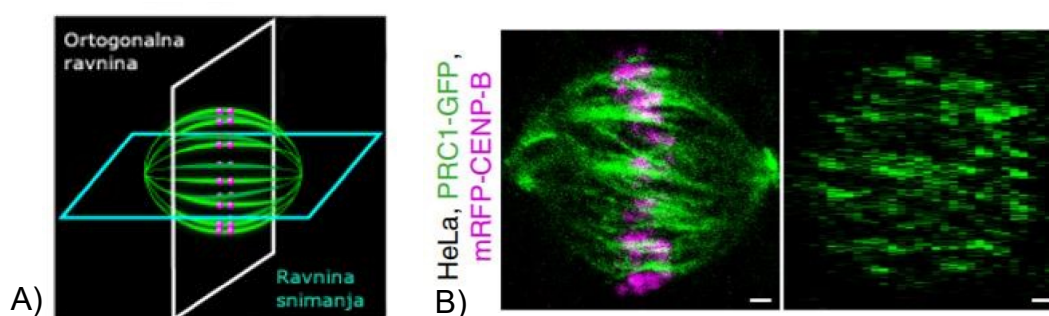
Kako bi se analizirao intenzitet signala HAUS6 i na temelju dobivenih vrijednosti odredila uspješnost metode utišavanja ekspresije augmina sa siRNA HAUS6, za svaku snimljenu stanicu u programu ImageJ napravljena je suma intenziteta središnje tri ravnine vretena. Alatom *Polygon selections* obuhvaćena je površina koju zauzima vreteno i uzeta srednja vrijednost intenziteta signala (eng. *mean*, vrijednost dobivena kao kvocijent ukupnog intenziteta i površine). Budući da se ovom analizom želi utvrditi koliko je proteina specifično lokalizirano na vreteno, oduzet je pozadinski signal (eng. *background signal*), tako što je u citoplazmi alatom *Rectangle* napravljen kvadrat čija je srednja vrijednost intenziteta signala oduzeta od srednje vrijednosti intenziteta signala vretena (slika 13).



**Slika 13. Analiza intenziteta signala HAUS6.** A) *Polygon selections* alat korišten je kako bi se obuhvatila površina koju zauzima vreteno i dobivena je srednja vrijednost intenziteta signala HAUS6. B) *Rectangle* alatom napravljen je kvadrat veličine 30 × 30 piksela i dobivena je srednja vrijednost intenziteta signala pozadinskog šuma.

### 3.3.2. Transformacija horizontalnog prikaza vretena u vertikalni prikaz

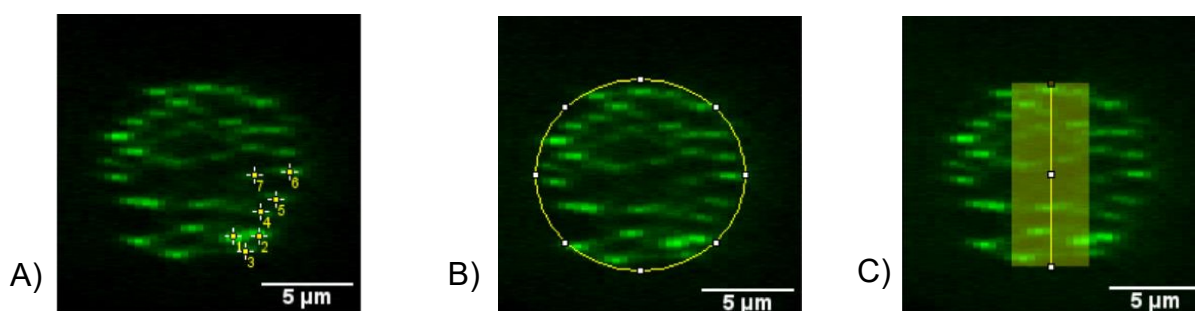
Slike s mikroskopa nastaju na način da se snime ravnine udaljene za  $0,5 \mu\text{m}$  i time se dobije *Z-stack* koji predstavlja 3D sliku vretena. Zahvaljujući algoritmu napisanom u računalnom jeziku R<sup>38</sup>, moguće je transformirati horizontalno vreteno za 90 stupnjeva (slika 14). Na slici 14B prikazan je poprečni presjek vretena i grupirani zeleni pikseli predstavljaju jedan svežanj mikrotubula. Da bi se svežnjevi što preciznije mogli odrediti snimljene su samo stanice kojima se oba pola nalaze u istoj ravnini, a prije transformacije slike vretena su rotirane tako da duža os vretena bude paralelna s x-osi.<sup>38</sup>



**Slika 14. Transformacija horizontalnog prikaza vretena u vertikalni prikaz.** A) Plavi pravokutnik označava ravninu snimanja na mikroskopu u odnosu na položaj vretena. Bijeli pravokutnik prikazuje ravninu dobivenu transformacijom pomoću algoritma napisanom u računalnom jeziku R. B) Primjer vretena koje je snimljeno u horizontalnom prikazu i nakon toga transformirano u vertikalni prikaz. Skala je  $1 \mu\text{m}$ . Preuzeto i obrađeno prema ref. 38

### 3.3.3. Analiza vertikalnog prikaza vretena

Za svaki vertikalni prikaz napravljena je suma signala središnjih 10 ravnina kako bi svežnjevi bili bolje vidljivi. Na tako dobivenim slikama moguće je prebrojati svežnjeve mikrotubula u središnjem presjeku. Svežnjem mikrotubula smatrala se svaka skupina grupiranih zelenih piksela odvojenih od druge (Slika 15).



**Slika 15. Analiza vertikalnog vretena.** A) Način numeriranja svežnjeva mikrotubula. B) *Oval selections* koji omogućuje dobivanje informacija o površini i ukupnom signalu u poprečnom presjeku. C) *Straight line* alatom debljine 50 piksela dobiven je profil intenziteta signala u označenom dijelu.

Na istoj sumi za svaku stanicu određena je površina poprečnog presjeka vretena i ukupan intenzitet signala obilježenog proteina pomoću alata *Oval selections*. (slika 15 B). Za neke od dobivenih slika bilo je potrebno dobiti profile intenziteta u poprečnom presjeku što je napravljeno pomoću alata *Straight line* debljine 50 piksela. (slika 15 C). Budući da sva vretena nisu iste širine, vrijednosti na x-osi u grafičkom prikazu podijeljene su sa širinom vretena i time je dobivena normirana širina vretena.

## 3.3.4. Kvantifikacija raspodjele mikrotubula u poprečnom presjeku vertikalnog vretena

U stanicama HeLa PRC1 GFP određen je omjer intenziteta signala vanjskog obruča vretena koji je nazvan *relativni intenzitet prstena* ( $I_{\text{prsten}}^{\text{rel}}$ ) i središta vretena koji je nazvan *relativni intenzitet sredine* ( $I_{\text{sredina}}^{\text{rel}}$ ).  $A_{\text{pop.presjek}}$  je površina poprečnog presjeka, a  $A_{\text{sredina}}$  je površina sredine. Promjer središta određen je kao jedna polovina zbroja širine i duljine poprečnog presjeka (slika 16).  $I_{\text{prsten}}^{\text{rel}}$  dobiven je prema formuli (3.3.4.1).

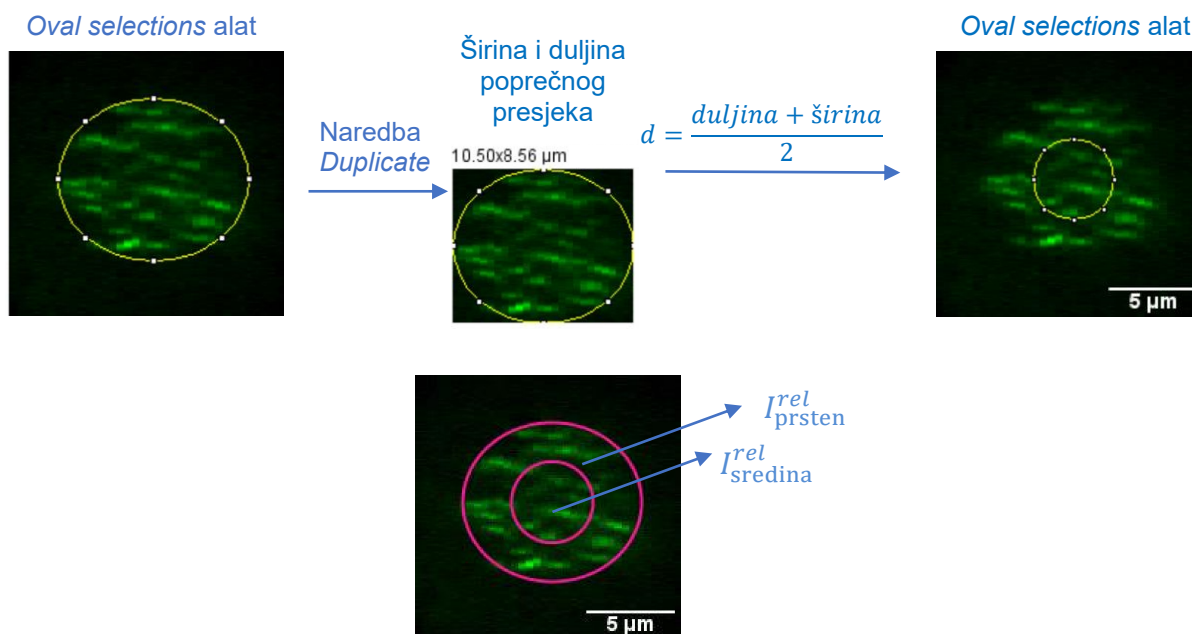
$$I_{\text{prsten}}^{\text{rel}} = \frac{I_{\text{pop.presjek}} - I_{\text{sredina}}}{A_{\text{pop.presjek}} - A_{\text{sredina}}} \quad (3.3.4.1)$$

$I_{\text{sredina}}^{\text{rel}}$  dobiven je prema formuli (3.3.4.2).

$$I_{\text{sredina}}^{\text{rel}} = \frac{I_{\text{sredina}}}{A_{\text{sredina}}} \quad (3.3.4.2)$$

Izračunat je omjer relativnog intenziteta prstena i sredine poprečnog presjeka prema izrazu (3.3.4.3):

$$I_{\text{prsten}}^{\text{rel}} : I_{\text{sredina}}^{\text{rel}} \quad (3.3.4.3)$$

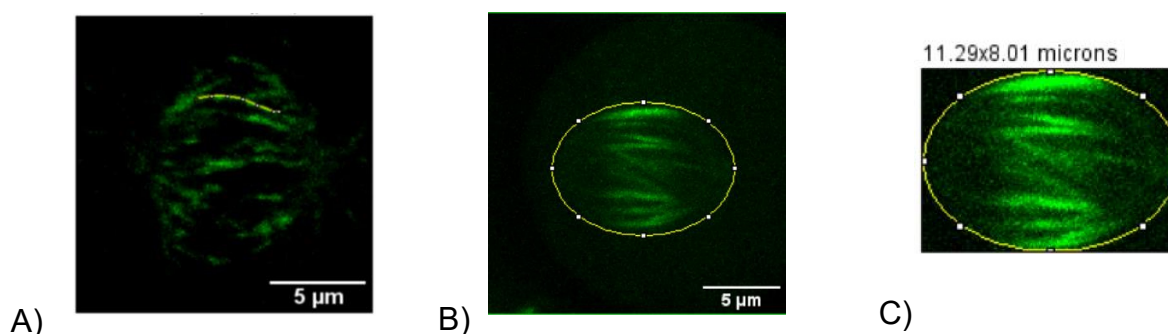


**Slika 16. Shematski prikaz izračuna omjera signala PRC1 u prstenu i sredini poprečnog presjeka vretena.** Elipsa koja okružuje sve svežnjeve mikrotubula duplicirana je i dobivena je širina i dužina poprečnog presjeka. Radijus male kružnice dobiven je kao aritmetička sredina duljine i širine poprečnog presjeka, a kružnica je napravljena sa središtem koji odgovara središtu velike elipse.

### 3.3.5. Analiza horizontalnog prikaza vretena

Horizontalni prikaz vretena korišten je za mjerenje duljine antiparalelnog presjeka mikrotubula u središtu vretena na kojem lokalizira protein PRC1. Odabrane su tri ravnine u kojima se presjek dobro vidi i napravljena je maksimalna projekcija signala. U citoplazmi je izmjeren signal pozadinskog šuma i prikaz je skaliran tako da prikazuje samo intenzitete iznad signala pozadine. Alatom *Segmented line* označeno je preklapanje mikrotubula i tako je izmjerena duljina. (slika 17 A).

Stanicama koje su snimljene žive bez fiksacije određena je duljina i širina na način da je napravljena maksimalna projekcija svih ravnina u kojima se vidi vreteno i alatom *Oval selections* napravljena elipsa koja obuhvaća vreteno (slika 17 B). Kada se elipsa izdvoji naredbom *Duplicate* očitaju se vrijednosti duljine i širine vretena (slika 17 C).



**Slika 17. Analiza horizontalnog vretena.** A) Alatom *Segmented line* označeno je preklapanje mikrotubula nakon što je prikaz skaliran za vrijednost intenziteta pozadinskog šuma. B) Alatom *Oval selections* napravljena elipsa koja obuhvaća vreteno. C) Naredbom *Duplicate* dobiva se informacija o duljini i širini vretena.

Profil intenziteta signala jednog svežnja mikrotubula dobiven je korištenjem alata *Segmented line* na sumi signala tri ravnine u kojima je moguće vidjeti svežanj. Profili su napravljeni kako je prikazano na slici 17 A) uz širinu linije od 5 piksela za kanal u kojem je vidljiv PRC1 i tubulin.

### 3.3.6. Statistička analiza podataka

Svi eksperimenti izvedeni su tako da je napravljen kontrolni uzorak (u daljnjem tekstu: **kontrolne stanice, kontrola**) te tretirani uzorak za utišavanje ekspresije augmina u stanicama (u daljnjem tekstu: **stanice tretirane s siRNA HAUS6**). Za svaki eksperiment napravljen je neupareni t-test. Razlika između kontrolnog i tretiranog uzorka smatrana je značajnom ukoliko je p-vrijednost bila manja od 0,05. Za prikaz vrijednosti korištena je skripta UnivarScatter<sup>42</sup> u programu MATLAB. Vrijednost svakog mjerenja dana je kružićem, srednja vrijednost prikazana je crnom linijom, standardna devijacija tamnosivim pravokutnikom, a standardna greška srednje vrijednosti (eng. *Standard Error of the Mean*, SEM) svijetlosivim pravokutnikom.

Svi rezultati u radu dani su kao (srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška srednje vrijednosti) iz razloga što je za analizu između kontrolnih i tretiranih stanica bitnija razlika između dva skupa podataka, nego raspršenje unutar jednog skupa.

Vrijednosti intenziteta signala dane su kao proizvoljne jedinice (eng. *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 kontrolni i tretirani uzorak napravljeni paralelno, te snimljeni na identičan način, što je bio slučaj u ovom radu.

---

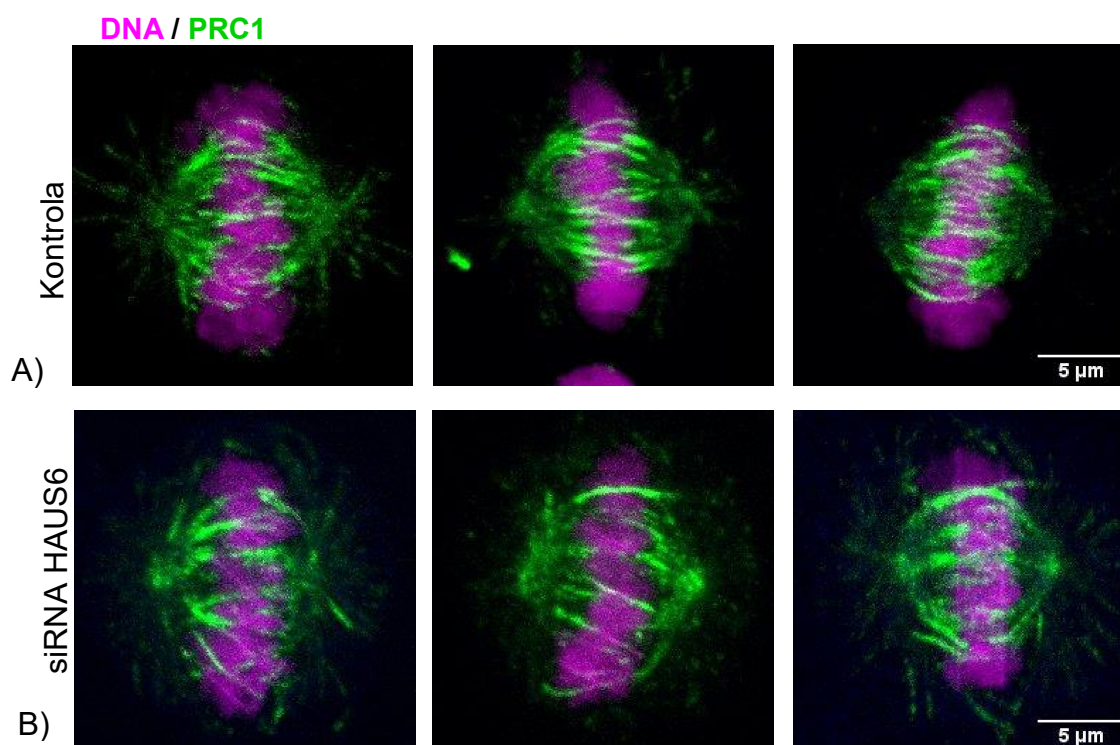


## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Utišavanje ekspresije augmina u stanicama HeLa divljeg tipa

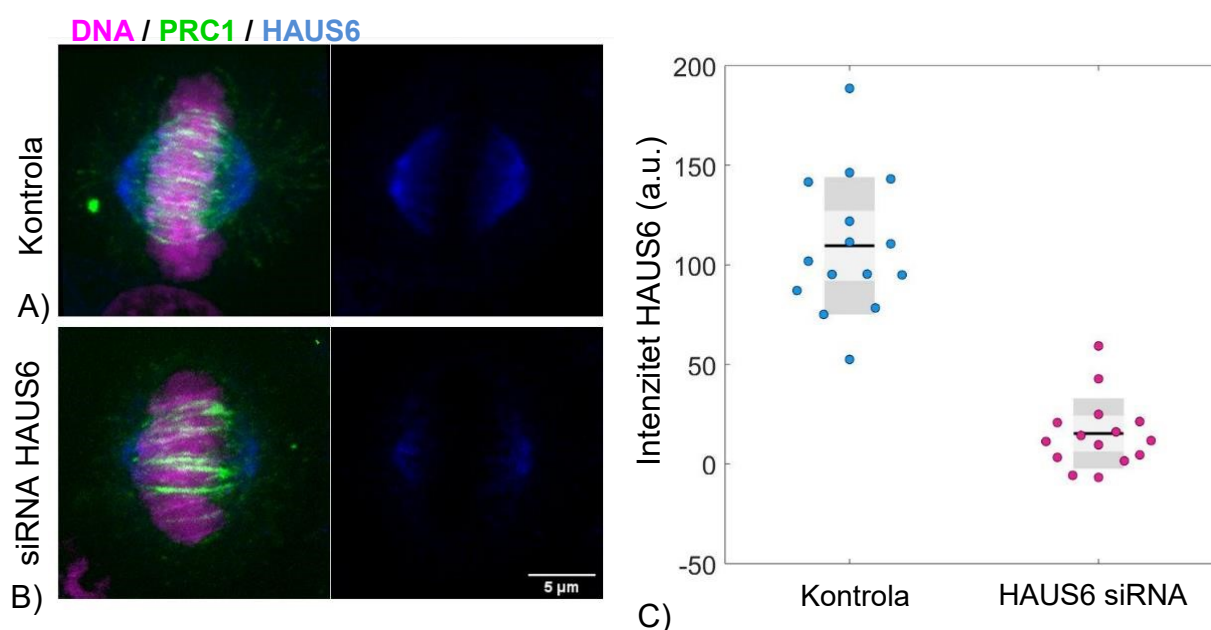
#### 4.1.1. Utišavanje ekspresije augmina značajno utječe na fenotip vretena

Kako bi se ispitala lokalizacija i uloga proteinskog kompleksa augmina u formiranju diobenog vretena, točnije antiparalelnih svežnjeva mikrotubula koji grade premošćujuća vlakna, u stanicama HeLa dt spriječena je biosinteza proteina HAUS6 metodom interferirajuće RNA. Riječ je o proteinu koji je ključna komponenta u kompleksu augmina jer se preko HAUS6 veže  $\gamma$ -TuRC i time omogućuje nukleaciju novog mikrotubula kad je prisutan u stanici<sup>15-17</sup>. Stanice su transfecirane metodom lipofekcije s siRNA 48h prije fiksacije i imunocitokemije. Paralelno je pripremljen uzorak istih stanica transfeciran s kontrolnom siRNA. Sve snimljene i analizirane stanice bile su u metafazi što je moguće uočiti po položaju DNA u središtu diobenog vretena. Značajna razlika u izgledu vretena bila je uočljiva odmah, vretena stanica tretiranih s siRNA HAUS6 su imala deformiran oblik i veće i nepravilnije svežnjeve mikrotubula (slika 18).



**Slika 18. Maksimalna projekcija 5 središnjih ravnina u stanicama HeLa dt.** Fluorescentno su obilježeni PRC1-Alexa-Fluor-488 nm (zeleno) i DNA-DAPI (ljubičasto). A) Kontrolne stanice tretirane s siRNA *Non-targeting Pool*. B) Stanice tretirane s siRNA HAUS6. Skala je 5  $\mu$ m.

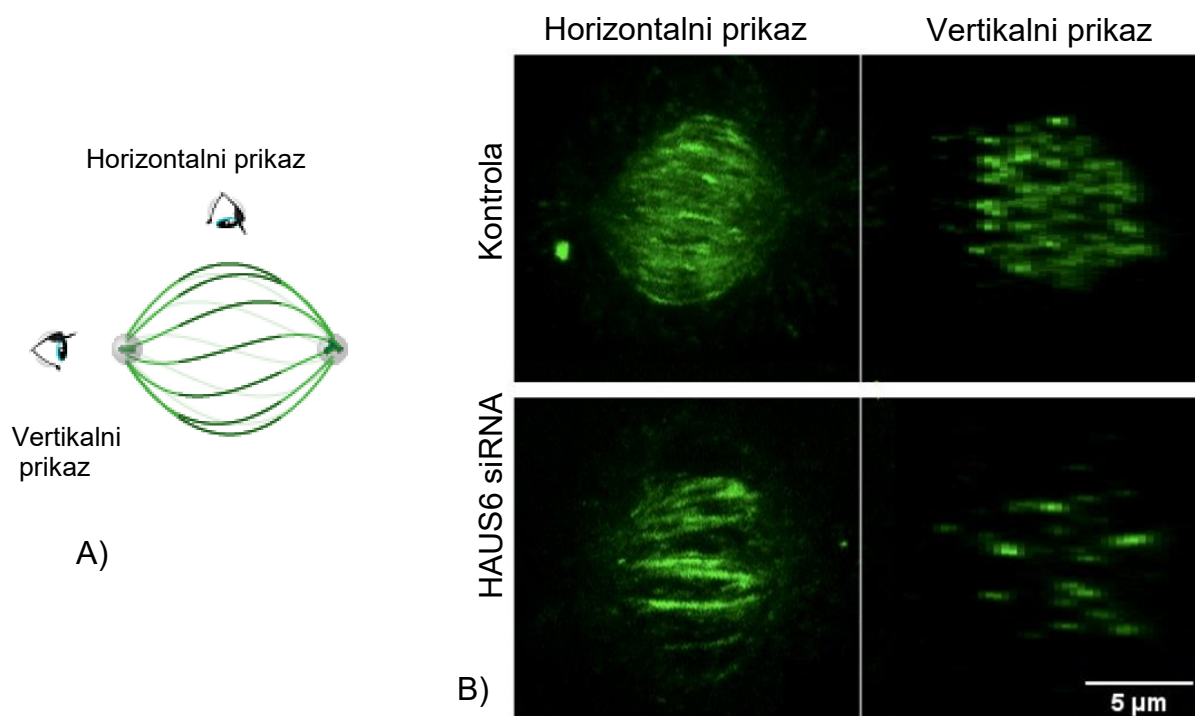
Kako bi se ispitala lokalizacija augmina u kontrolnim stanicama, kao i stanicama u kojima je ekspresija augmin utišana, podjedinica HAUS6 je vizualizirana imunocitokemijskom metodom. Augmin se u kontrolnim stanicama u metafazi nalazi u blizini pola, što je očekivano prema literaturnim podacima. Nakon utišavanja ekspresije HAUS6 vidno je manje proteina na vretenu (plavo), a izmijenio se oblik i smanjio broj svežnjeva mikrotubula obilježenih s PRC1-Alexa Fluor-488 (slika 19 A i B). Signal HAUS6-Alexa Fluor-594 se smanjio za više od 80% (slika 19 B i C) što je zadovoljavajući rezultat koji upućuje da je metoda utišavanja ekspresije proteina HAUS6 pomoću ciljane siRNA uspješna. Prema tome, metoda se može koristiti za proučavanje uloge HAUS6, točnije kompleksa augmina u diobenom vretenu jer kompleks nije funkcionalan kad u stanici nije prisutna bilo koja od 8 podjedinica<sup>15-17</sup>.



**Slika 19. Imunocitokemija na stanicama HeLa dt fiksiranim 48 h nakon transfekcije.** PRC- Alexa Fluor-488 (zeleno); HAUS6-Alexa-Fluor-594 (plavo); DNA-DAPI (ljubičasto). A) Kontrolna stanica. B) Stanica tretirana s siRNA HAUS6. C) Kvantifikacija intenziteta HAUS6 proteina u stanicama HeLa dt. ( $p = 3 \times 10^{-10}$ ,  $N = 15$ ). Sve stanice snimljene su na isti način, skala je 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2. Transformacija horizontalnog prikaza u vertikalni prikaz omogućuje detaljnije proučavanje arhitekture vretena

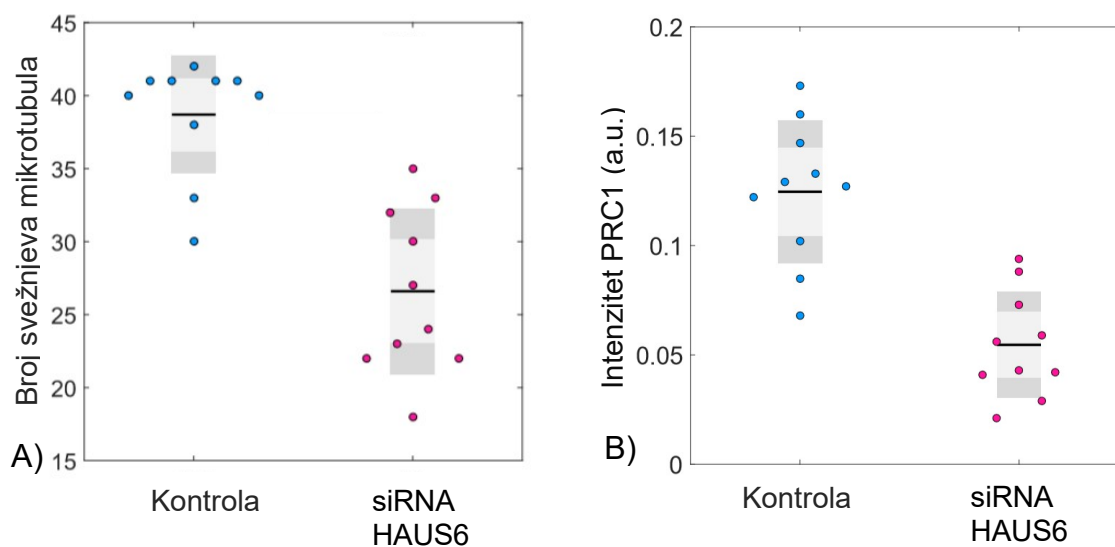
Kako bi se pobliže proučio utjecaj utišavanja augmina na antiparalelne svežnjeve mikrotubula i dobio detaljniji uvid u arhitekturu vretena, slike dobivene u horizontalnom prikazu su transformirane pomoću algoritma u programu R programskom jeziku<sup>38</sup> (Slika 20).



**Slika 20. Stanice HeLa dt s obilježenim PRC1-Alexa Fluor-488.** A) Shema koja prikazuje način gledanja vretena u horizontalnom i vertikalnom prikazu. B) Prikazana je maksimalna projekcija stanica u horizontalnom prikazu kako su snimljene na mikroskopu (lijevi stupac) i poprečni presjek vretena kao suma intenziteta 10 središnjih ravnina nakon transformacije u vertikalni prikaz (desni stupac). Skala je 5 µm.

Vertikalni prikaz dobiven transformacijom jasno ukazuje na promjenu u fenotipu. Broj svežnjeva mikrotubula je u stanicama tretiranim s HAUS6 siRNA značajno niži. Zasebni svežnjevi koji su se mogli uočiti su pobrojani i u kontrolnim stanicama u metafazi broj svežnjeva bio je  $39 \pm 1$ , a nakon HAUS6 siRNA  $27 \pm 2$  (slika 21 A). Kako bi se provjerilo je li možda do promjene broja došlo zbog sljepljivanja svežnjeva, na istoj sumi intenziteta signala središnjih 10 ravnina izmjerena je signal fluorescencije PRC1 (slika 21 B). U kontrolnim stanicama signal je iznosio  $(0,13 \pm 0,01)$  a.u., a stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 na  $(0,056 \pm 0,007)$  a.u. Da su svežnjevi bili sljepljeni, tj. da je došlo tek do preraspodjele svežnjeva u vretenu, signal

bi imao isti iznos. U ovom slučaju signal je za ~60 % manji nakon utišane ekspresije. Time je dobiveni rezultat u slaganju s pretpostavkom da će uslijed utišane ekspresije kompleksa augmina doći do redukcije broja mikrotubula.

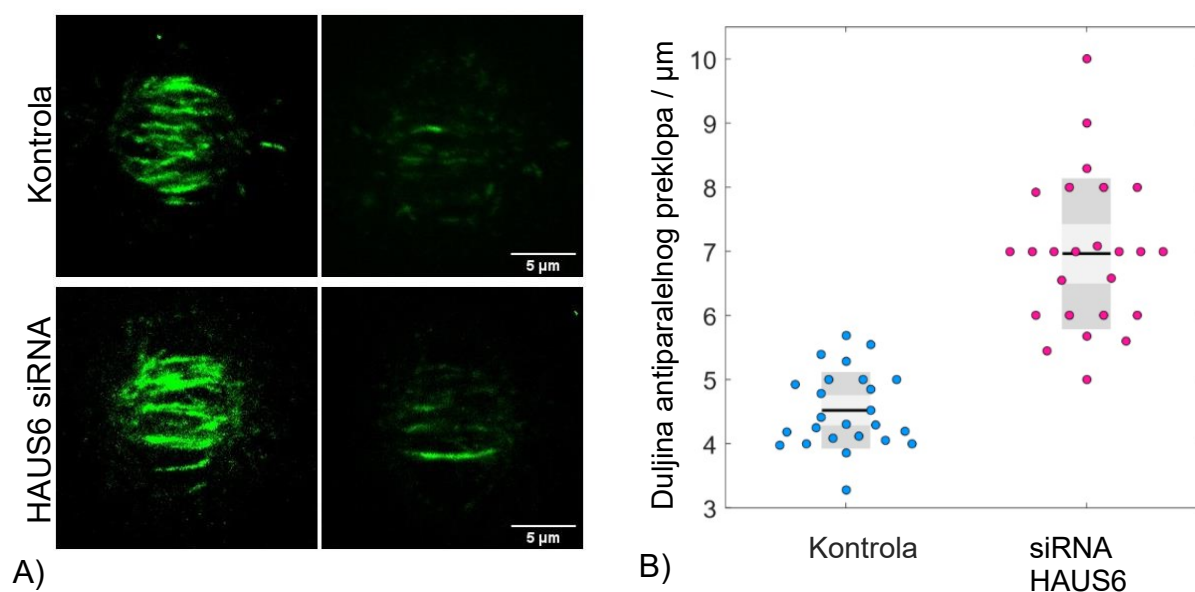


**Slika 21. Kvantifikacija broja i signala svežnjeva mikrotubula u poprečnom presjeku vretena stanica HeLa dt.** A) Broj zasebnih svežnjeva mikrotubula obilježenih s PRC1-Alexa Fluor-488. ( $p = 3 \times 10^{-5}$ ,  $N = 10$ ) B) Intenzitet signala svežnjeva obilježenih s PRC1-Alexa Fluor-488 u poprečnom presjeku vretena. ( $p = 3 \times 10^{-5}$ ,  $N = 10$ )

## 4.1.3. Utišavanje ekspresije augmina potencijalno utječe na duljinu antiparalelnog preklopa

Osim redukcije broja, na slikama je primijećeno da se antparalelni preklop u vretenu obilježen s PRC1 čini duži u stanicama tretiranim s HAUS6 siRNA u odnosu na kontrolne stanice. Pomoću alata *Segmented line* u ImageJ programu izmjerena je duljina preklopa. Preklop je u kontrolnim stanicama iznosio  $(4,5 \pm 0,1) \mu\text{m}$ , a stanicama tretiranim s HAUS6 siRNA  $(6,9 \pm 0,2 \mu\text{m})$ . Duži preklopi lakše su uočljivi u ravninama udaljenijim od osi vretena (slika 22).

Stanice se također čine duže, no u imunocitokemiji nije moguće dobiti reprezentativan broj za duljinu vretena jer fiksacija metanolom korištena u ovom radu značajno utječe na arhitekturu vretena. Metanol i drugi alkoholni fiksativi pokazali su se uspješnim pri očuvanju nukleinskih kiselina, ali dolazi do gubitka stanične membrane, citoplazmatskih organela, te oštećenja mikrotubula. Metanol se i dalje koristi kao fiksativ jer s druge strane omogućuje visoku uspješnost imuno-označavanja i nizak pozadinski signal<sup>49-51</sup>. Iz tog razloga bilo je potrebno ispitati odnos broja i duljine svežnjeva obilježenih s PRC1 u stanicama koje nisu fiksirane.

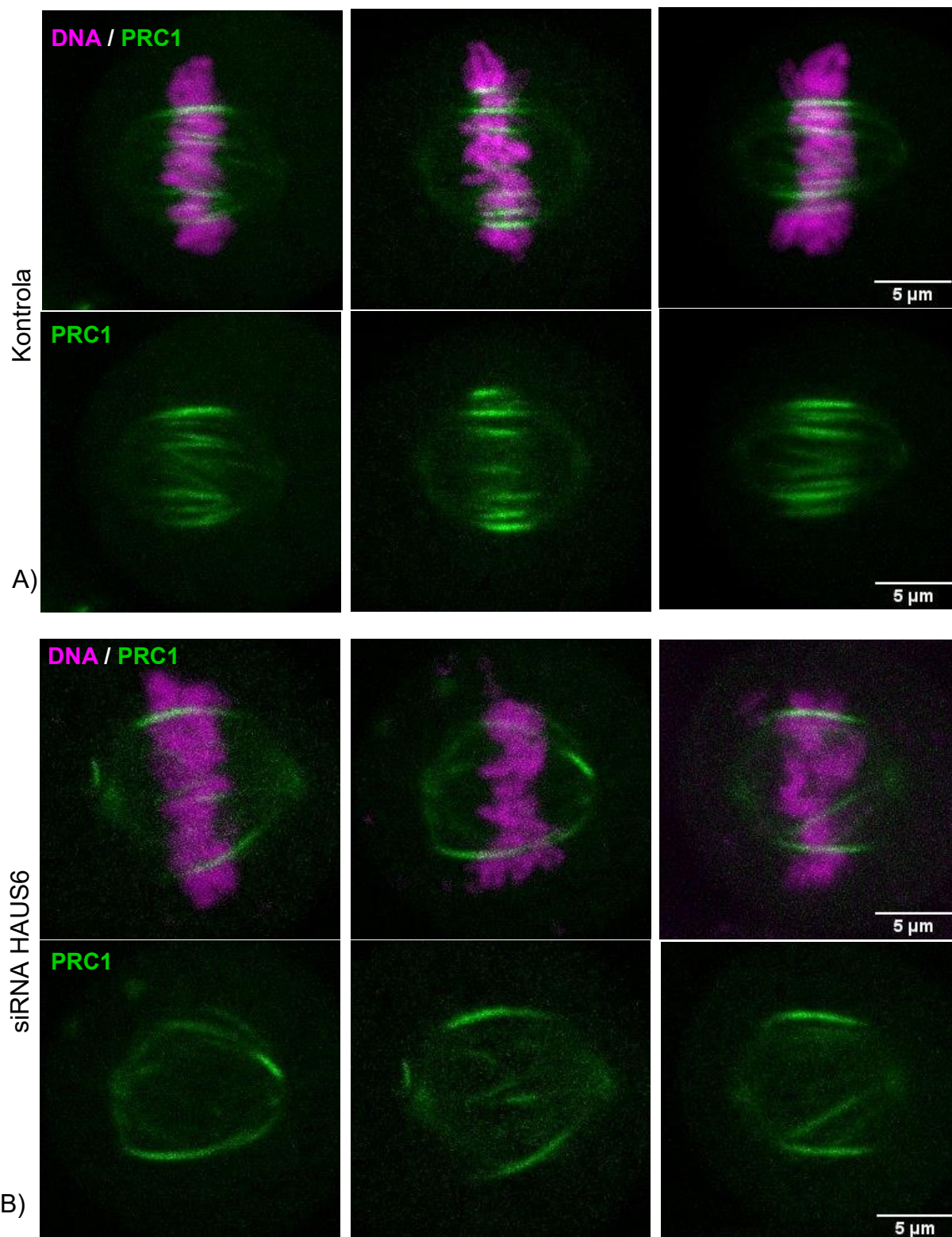


**Slika 22. Antiparalelna preklapanja mikrotubula obilježenih s s PRC1-Alexa Fluor-488 u stanicama HeLa dt.** A) Središnja ravnina vretena (lijevi stupac) i ravnina udaljena od osi vretena (desni stupac). Skala je  $5 \mu\text{m}$ . B) Duljina je izmjerena na 5 stanica za kontrolu i siRNA HAUS6, u svakoj stanici izmjereno je 5 svežnjeva. ( $p = 3 \times 10^{-12}$ ).

## 4.2. Utišavanje ekspresije augmina u stanicama HeLa PRC1 GFP

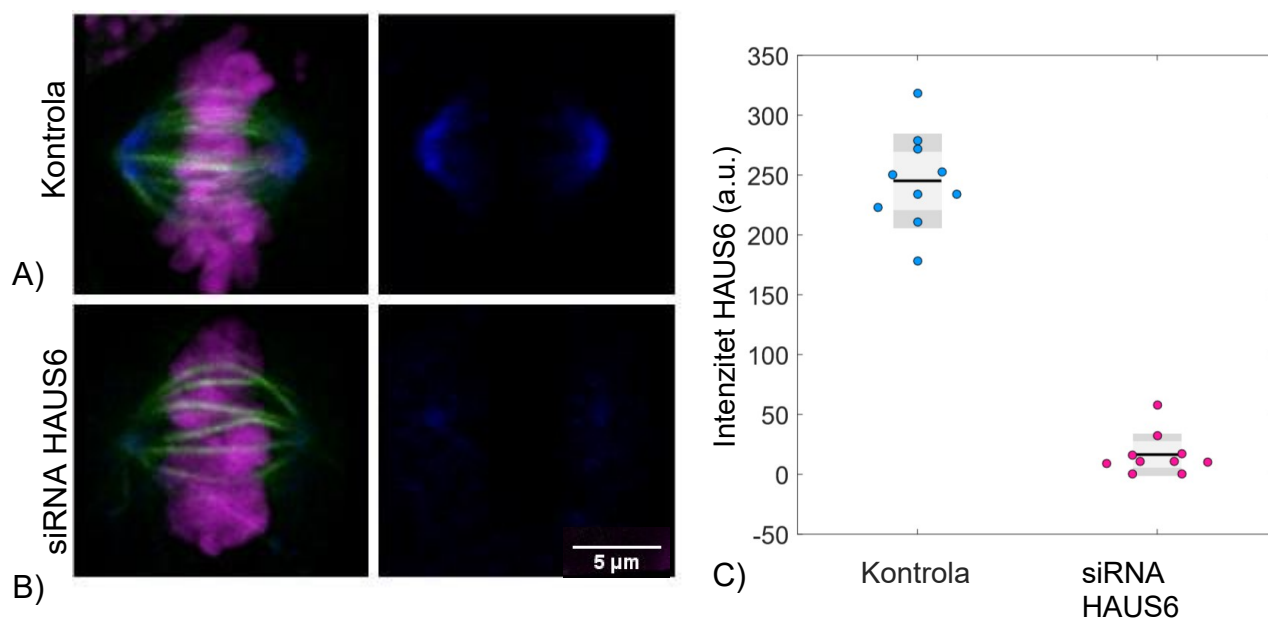
### 4.2.1. *Žive stanice u odnosu na fiksirane pokazuju drastičniji fenotip u formiranju diobenog vretena kada im je onemogućena ekspresija augmina*

Kako bi se izbjegle negativne posljedice na arhitekturu vretena koje uzrokuje fiksacija na stanice, poželjno je metodama genetičkog inženjerstva u živim stanicama eksprimirati fluorescentno obilježeni protein. U sljedećem eksperimentu korištene su stanice HeLa PRC1 GFP u kojima je protein PRC1 stabilno eksprimiran pomoću transfekcije stanica HeLa s bakterijskim umjetnim kromosomom, BAC (eng. *bacterial artificial chromosome*) koji je imao odgovarajući fluorescentni biljeg<sup>37</sup>. Time je PRC1 s fluorescentnim biljegom u obliku GFP proteina unesen u genom stanične linije i nastala je nova linija u kojoj će svaka generacija stanica imati fluorescentno obilježeni protein. Stanice su transfecirane s kontrolnom siRNA i siRNA za HAUS6, te inkubirane 48 h. 15 minuta prije snimanja dodana je SiR-DNA za vizualizaciju kromosoma. Utišavanjem augmina i potom snimanjem živih stanica uočljiv je drastičniji fenotip nego uslijed fiksacije. Nastali svežnjevi mikrotubula su naizgled duži, a vreteno je duže i šire u stanicama koje ne mogu eksprimirati augmin u odnosu na kontrolne stanice (slika 23). Primijećeno je da je DNA u metafaznoj ploči, ali nije tako pravilno stisnuta u poprečnu liniju kao u kontrolnim stanicama.



**Slika 23. Maksimalna projekcija 5 središnjih ravnina u stanicama HeLa PRC1 GFP.** Fluorescentno su obilježeni PRC1-GFP (zeleno) i SiR-DNA (ljubičasto). A) Kontrolne stanice tretirane s siRNA *Non-targeting Pool*. B) Stanice tretirane s siRNA HAUS6.

Efikasnost metode je kao i u prethodnom eksperimentu dokazana imunocitokemijom (slika 24) tako što je antitijelima obilježen HAUS6 u kontrolnim stanicama i stanicama tretiranim s siRNA za HAUS6.

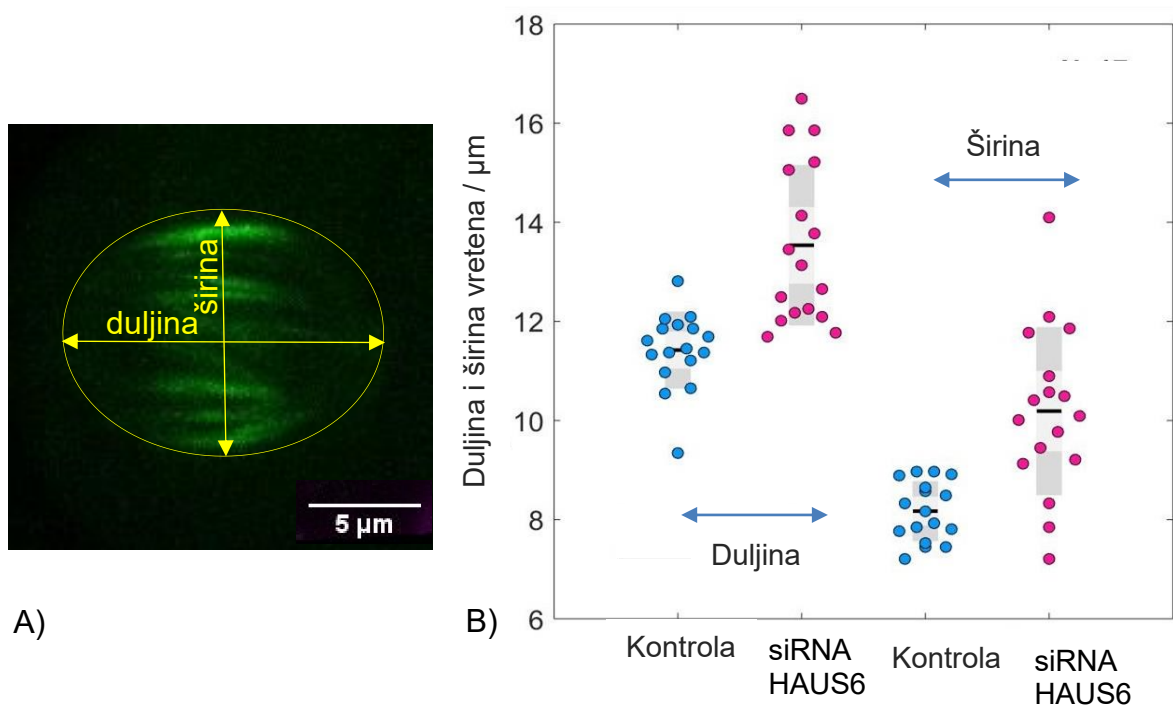


**Slika 24. Imunocitokemija na stanicama HeLa PRC1 GFP fiksiranim 48 h nakon transfekcije.** PRC1-GFP (zeleno); HAUS6-Alexa-Fluor-594 (plavo); SiR-DNA (ljubičasto). A) Kontrolne stanica. B) Stanica tretirana s siRNA HAUS6. Sve stanice snimljene su na isti način, skala je 5 μm. C) Kvantifikacija intenziteta HAUS6 proteina u stanicama HeLa PRC1-GFP. ( $p = 1 \times 10^{-12}$ ,  $N = 10$ ).



#### 4.2.2. Diobena vretena koja se formiraju u nedostatku augmina su šira i duža, a u poprečnom presjeku nema svežnjeva mikrotubula

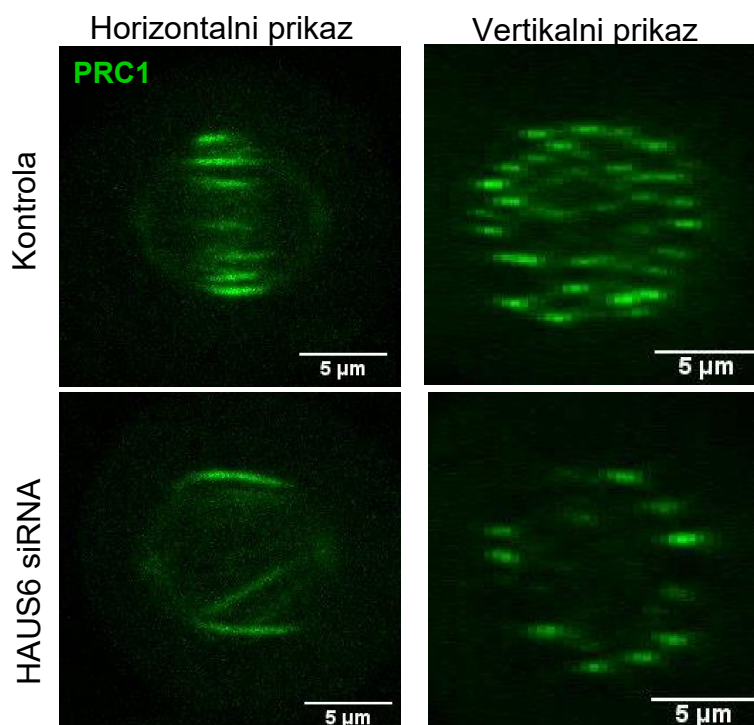
Stanice HeLa PRC1 GFP koje ne mogu eksprimirati funkcionalni augmin uspjele su formirati diobena vretena, ali su ta vretena značajno dulja i šira za faktor povećanja 1,2 u odnosu na kontrolne stanice, što je kvantificirano kako je prikazano na slici 25.



**Slika 25. Duljina i širina diobenog vretena u stanicama HeLa PRC1 GFP.** A) Duljina vretena je udaljenost od pola do pola u horizontalnom prikazu vretena, tj. velika os elipse kojom je okruženo vreteno, a širina vretena je mala os elipse. B) Dolazi do povećanja dimenzija vretena u horizontalnom presjeku nakon utišavanja ekspresije augmina. Duljina i širina izmjerene su na 17 stanica, ( $p(\text{duljina}) = 3 \times 10^{-5}$ ,  $p(\text{širina}) = 6 \times 10^{-5}$ ), skala je  $5 \mu\text{m}$ .

U stanicama tretiranim s HAUS6 siRNA uočljiv je veći rasap vrijednosti za duljinu i širinu u odnosu na kontrolne stanice. Razlog tolike razlike u veličini vretena bit će objašnjen u poglavlju 4.4.

Kako bi se detaljnije ispitaio fenotip nakon utišavanja augmina, snimke stanica snimljenih u horizontalnom prikazu transformirane su u vertikalni prikaz (slika 26).

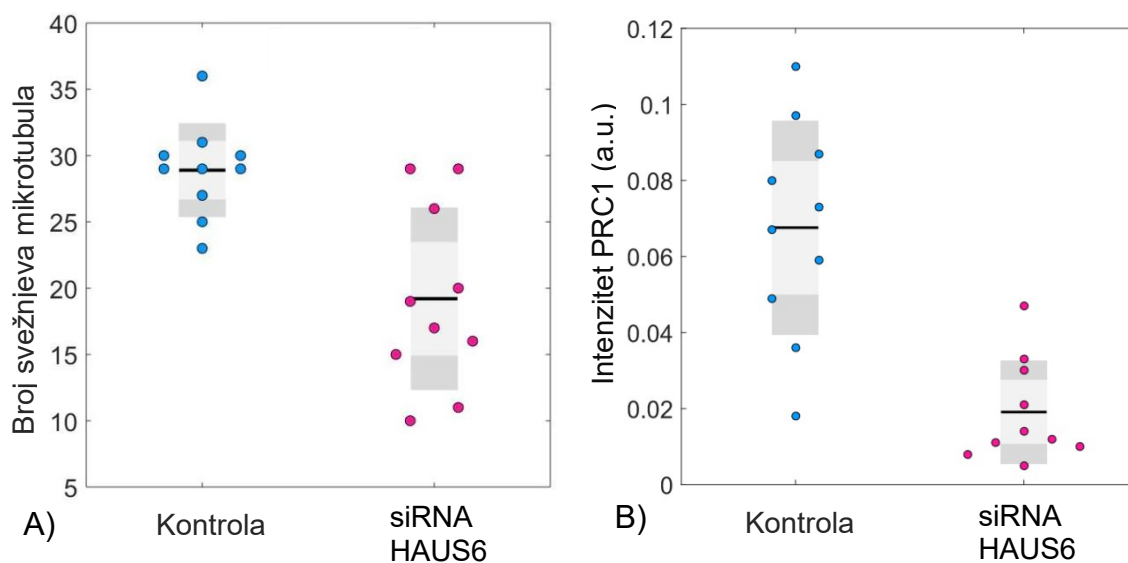


**Slika 26. Stanice HeLa PRC1-GFP.** Prikazana je maksimalna projekcija stanica u horizontalnom prikazu kako su snimljene na mikroskopu (lijevo) i poprečni presjek vretena kao suma intenziteta 10 središnjih ravnina nakon transformacije u vertikalni prikaz (desno). Skala je 5 μm.

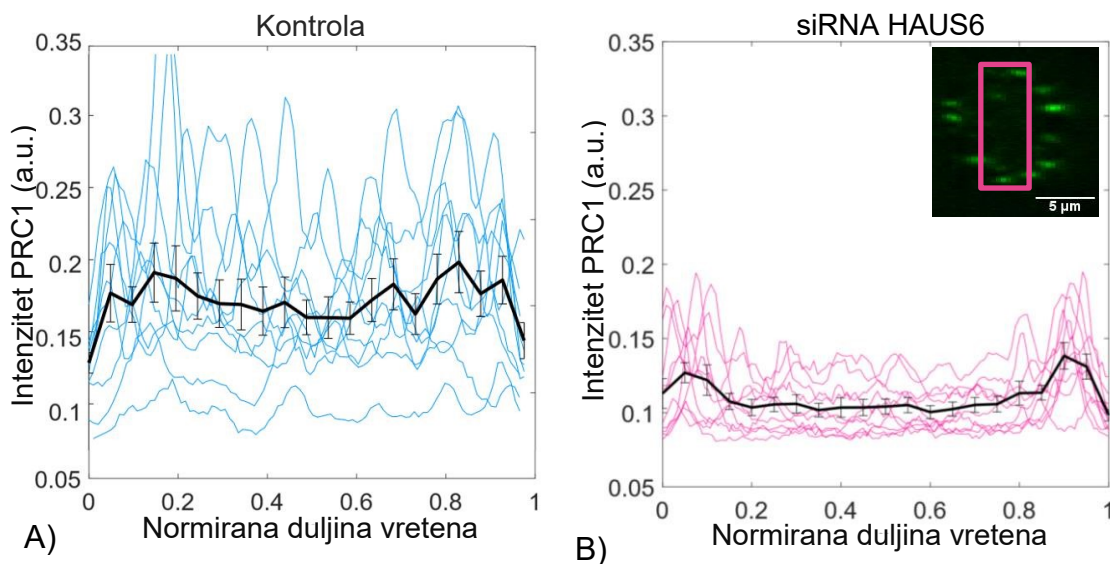
Kao i u stanicama HeLa dt i kod stanica HeLa PRC1-GFP dolazi do smanjenja broja mikrotubula i ukupnog intenziteta signala PRC1 u poprečnom presjeku što je izmjereno (slika 27) za vretena u metafazi kao što je prije pojašnjeno. U kontrolnim stanicama u metafazi broj svežnjeva bio je ( $27 \pm 1$ ), a u stanicama tretiranim s HAUS6 siRNA ( $20 \pm 2$ ). Smanjenje intenziteta signala PRC1 s ( $0,067 \pm 0,009$ ) u kontrolnim stanicama na ( $0,019 \pm 0,004$ ) a.u. u tretiranim stanicama pokazuje da nije došlo do preraspodjele mikrotubula, već je manje PRC1 u stanici jer je manje mikrotubula na koje se može vezati.

Osim očekivanog fenotipa, u 9/10 analiziranih stanica primijećeno je da u središtu poprečnog presjeka gotovo nema svežnjeva mikrotubula (kao na slici 20). Profili intenziteta dobiveni pomoću *Straight line* alata prikazani su grafički (slika 28). Na grafu koji odgovara stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 uočljiv je pad signala u središtu vretena. Također,

maksimalni signal je manji što je u slaganju sa smanjenjem ukupnog signala PRC1 u poprečnom presjeku.

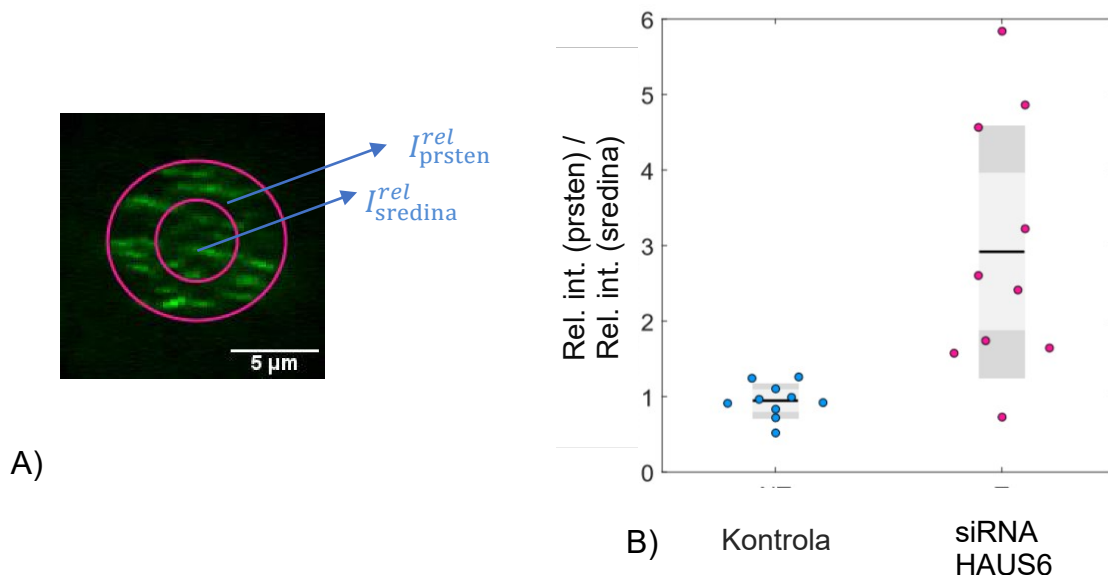


**Slika 27. Kvantifikacija broja i signala svežnjeva mikrotubula u poprečnom presjeku vretena stanica HeLa PRC1-GFP.** A) Broj zasebnih svežnjeva mikrotubula obilježenih s PRC1-GFP. ( $p = 9 \times 10^{-4}$ ,  $N = 10$ ) B) Intenzitet signala svežnjeva obilježenih s PRC1 u poprečnom presjeku vretena. ( $p = 1 \times 10^{-4}$ ,  $N = 10$ )



**Slika 28. Profil intenziteta signala u poprečnom presjeku vretena.** A) Kontrolne stanice. B) Stanice tretirane s siRNA HAUS6. U gornjem desnom kutu je prikaz poprečnog presjeka vretena. Ružičasti kvadrat označava područje mjerenja intenziteta signala. Debela crna linija je srednja vrijednost, a vertikalne crne linije su SEM.  $N=10$

Omjer relativnog intenziteta signala u prstenu i relativnog intenziteta signala u središtu vretena pokazao je da je omjer intenziteta gotovo tri puta veći u stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 u odnosu na kontrolne stanice (slika 29). U kontrolnim stanicama u metafazi omjer iznosi  $(2,9 \pm 0,5)$ , a u stanicama tretiranim s HAUS6 siRNA  $(0,9 \pm 0,7)$ .

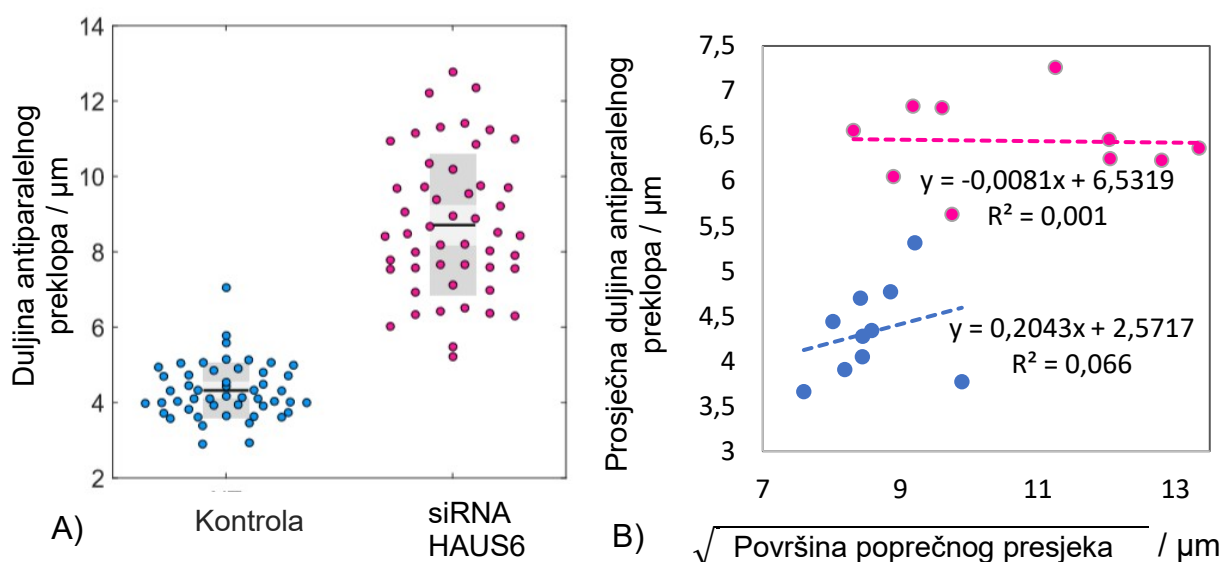


**Slika 29. Kvantifikacija raspodjele mikrotubula u poprečnom presjeku vretena.** A) Shema poprečnog presjeka vretena s označenim izračunatim veličinama. B) Omjer intenziteta signala u prstenu i u središtu vretena ( $p = 0,0016$ ,  $N = 10$ )

Rezultat da antiparalelnih preklapanja mikrotubula gotovo nema u središtu bio je iznenađujući, posebno zato što je DNA prisutna u cijelom poprečnom presjeku, što je jasno već i iz horizontalnog prikaza. U prethodnim istraživanjima mjerena gustoća signala tubulina u cijelom vretenu i dobiveno je da je u središtu vretena između dva pola gustoća mikrotubula puno manja nakon što je utišan augimin. Pri tome nije bilo jasno je li došlo do redukcije mikrotubula u svežnjevima ili do redukcije svežnjeva. *In vitro* istraživanjima dobiveno je da augmin omogućuje grananje mikrotubula i pretpostavljeno je da uslijed utišavanja augmina ne nastaje dovoljno interpolarnih mikrotubula u središnjem dijelu u metafazi<sup>53</sup>. Ovaj rezultat u kojem je vizualiziran PRC1 upućuje na to da je augmin ključan za povećanje broja svežnjeva mikrotubula u obliku grana u središtu vretena. Dosada nije opažen fenotip da će se uslijed smanjene nukleacije mikrotubula preostali mikrotubuli posložiti u prstenastu strukturu udaljenu od osi vretena, primarno zato što su u ovom radu prvi put vizualizirani zasebni snopovi pomoću proteina PRC1 u poprečnom presjeku, a ne samo tubulin u horizontalnom prikazu.

## 4.2.3. Kompleks augmin potencijalno doprinosi nukleaciji premošćujućih vlakana

Osim što se vreteno povećalo, primijećeno je u i živim stanicama da dolazi do značajnog povećanja antiparalelnog preklopa (slika 30 A). U kontrolnim stanicama antiparalelni preklap dug je  $(4,3 \pm 0,1) \mu\text{m}$ , a stanicama u utišanom ekspresijom augmina taj iznos je dvostruko veći i iznosi  $(8,7 \pm 0,3) \mu\text{m}$ . Da se ispita mogućnost je li do povećanja preklopa dolazi uslijed povećanja čitavog vretena (poglavlje 4.2.2.), prikazana je ovisnost korijena površine poprečnog presjeka i antiparalelnog preklapanja (slika 30 B). Pritom nije uočena značajna korelacija. Time je zaključeno da je je produljenje antiparalelnog preklopa još jedna od posljedica formiranja vretena u nedostatku augmina, te da bi mikrotubuli nastali nukleacijom putem augmina mogli bitno utjecati na održavanje pravilne duljine preklopa.

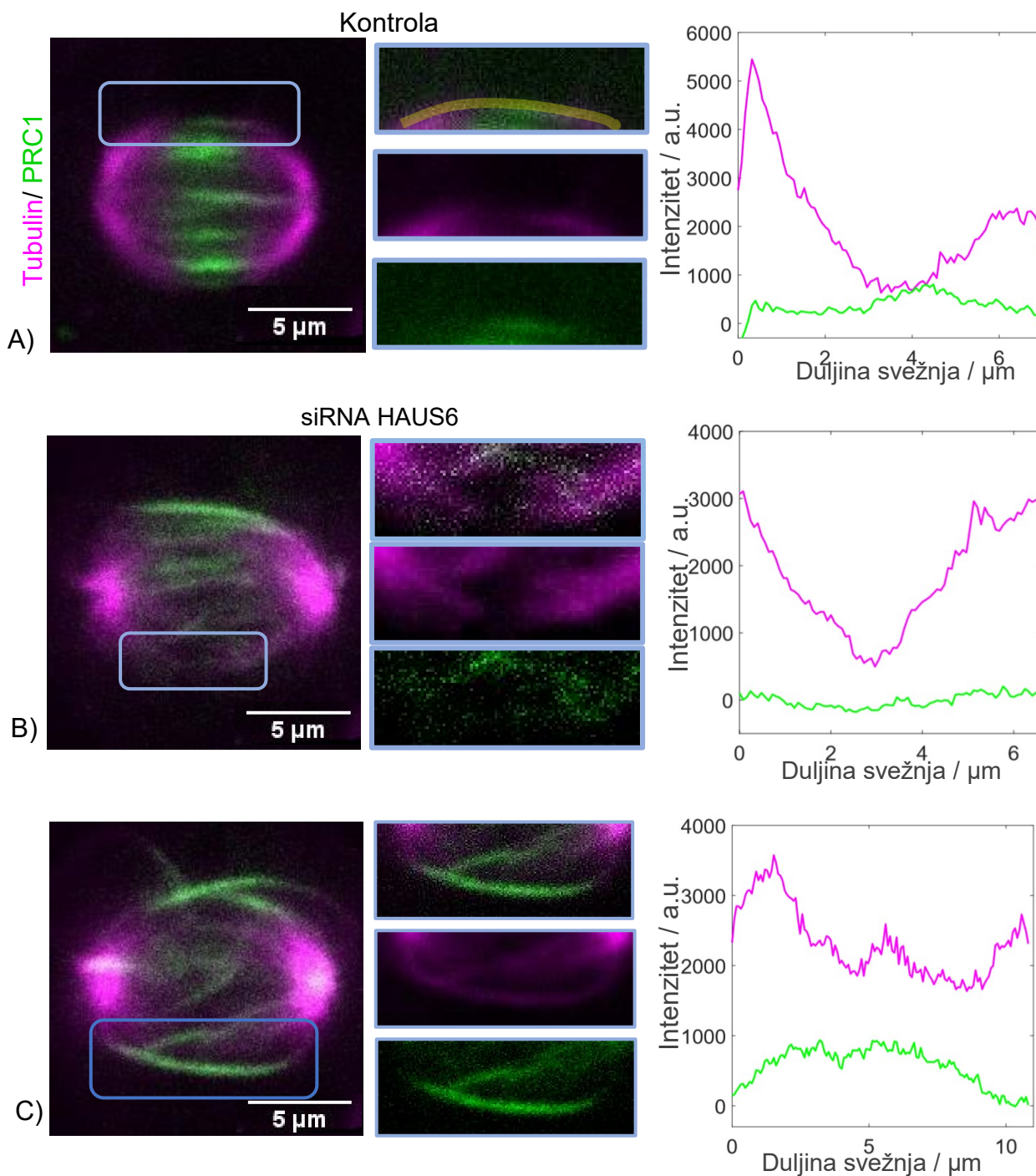


**Slika 30. Antiparalelna preklapanja mikrotubula obilježenih s PRC1-Alexa Fluor-488 u stanicama HeLa PRC1-GFP.** A) Antiparalelni preklopi mikrotubula izmjereni su na 10 stanica za kontrolu i siRNA HAUS6, u svakoj stanici izmjereno je 5 svežnjeva. ( $p = 4 \times 10^{-28}$ ). B) Prosječna duljina antiparalelnog preklopa za svaku stanicu u ovisnosti o korijenu površine poprečnog presjeka iste stanice.

Kako bi se dodatno pojašnio utjecaj utišavanja ekspresije augmina na antiparalelne preklope, a time i premošćujuća vlakna u vretenu, u stanice HeLa PRC1-GFP dodan je SiR-tubulin. Time su vizualizirani i paralelni i antiparalelni svežnjevi mikrotubula. U kontrolnim stanicama intenzitet signala tubulina bio je manji u središnjem području koji odgovara udaljenosti između dvije kinetohore koje podržava premošćujuće vlakno (slika 31 A). Upravo tu lokalizira PRC1 sa stabilnom ekspresijom. Treba naglasiti da je za vizualizaciju i kvantifikaciju signala bilo potrebno odabrati svežnjeve koji nemaju preklapanja s drugim svežnjevima mikrotubula, što je većinom moguće na svežnjevima udaljenijim od središta vretena.

U kontrolnim stanicama sva kinetohorna vlakna imala su antiparalelni preklap obilježen s PRC1 između kinetohora. U stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 u središtu vretena bilo je moguće uočiti svežnjeve koji su imali smanjenje intenziteta između dva kinetohornih vlakana kao u kontrolnim stanicama, ali signal PRC1 je nakon oduzimanja pozadinskog šuma bio približno 0 (Slika 31 B). Prosječno ( $4 \pm 1$ ) (srednja vrijednost  $\pm$  s.d.) svežnjeva mikrotubula koliko je bilo moguće analizirati po stanici prema prethodno opisanim kriterijima nije imalo lokaliziran PRC1 između kinetohornih vlakana. Takav rezultat u slaganju je s tim da je u središtu poprečnog presjeka vretena značajno manje mikrotubula obilježenih s PRC1 nakon tretmana s siRNA HAUS6. Također, izmjeren je i intenzitet signala u dugim antiparalelnim preklapanjima koji odgovaraju onima u prstenu poprečnog presjeka i signal PRC1 (slika 31 C) bio je približno istovjetan kao u kontrolnim stanicama. S druge strane, nije došlo do pada signala tubulina u središtu što upućuje na to da je riječ o interpolarnim vlaknima koji nisu vezani lateralno na kinetohore.

---



**Slika 31. Kolokalizacija proteina PRC1 i tubulina u stanicama HeLa PRC1 GFP.** Prikazana je suma 5 ravnina u kojima je uočen svežanj mikrotubula koji se ne preklapa s drugima. Plavim pravokutnikom označena regija je uvećana (A: 1,5 puta, B: 1,5 puta, C: 1 put) i prikazani su svi kanali (sredina). Intenziteti PRC1 (zeleno) i tubulina (ljubičasto) izmjereni su za svaki svežanj (slike desno), žuta linija prikazuje način mjerenja. A) Kontrolna stanica. B) i C) Stanica tretirana s siRNA HAUS6. B) Svežanj mikrotubula bez interpolarnog vlakna. C) Vanjski svežanj mikrotubula.

Ovaj rezultat upućuje na to da je amplifikacija mikrotubula putem augmina u središtu diobenog vretena ključna za nastajanje premošćujućih vlakana. Dosada je pokazano da distribucija slobodnih (+) krajeva mikrotubula koji se vežu na kinetohore ne odgovara modelu u kojem svi svežnjevi rastu isključivo s centrosoma<sup>39,40</sup>, kao što pretpostavlja 'Search-and-capture'<sup>13</sup> model. Premošćujuće vlakno dijelom je vezano na kinetohorno vlakno i sama arhitektura<sup>4</sup> odgovara tome da je nastalo grananjem posredovanim augminom na već postojećem kinetohornom vlaknu na mjestu udaljenom od pola. Ukoliko je smanjen broj mikrotubula u vretenu stanicama je potrebno puno više vremena da bi se uspostavila metafazna ploča i zadovoljila kontrolna točka ulaska u anafazu. Obzirom da je za aktivaciju kontrolne točke nužna podjednaka tenzija na kinetohore s oba pola i da je premošćujuće vlakno jedan od ključnih segmenata za generiranje sila u vretenu<sup>4</sup>, moguće je da zbog nedostatka upravo premošćujućeg vlakna dolazi do toliko dugačkog odgađanja početka anafaze<sup>15-17</sup>.

Treba naglasiti da SiR-tubulin nije idealan izbor za obilježavanje tubulina. Naime SiR-tubulin je netoksični derivat fluorescentnog taksolnog spoja 7-O-[N-(4'-fluorescinkarbonil)-l-alanil]taksola, komercijalno nazvanog Flutax-1, koji se veže samo na stabilne mikrotubule s odgodom ~ 12 s nakon polimerizacije tubulina<sup>46,47</sup>. Stoga nije moguće uočiti sve mikrotubule, osobito nestabilnije (+) krajeve kojih je najviše u središnjem dijelu vretena.

Za detaljno ispitivanje hipoteze da uslijed utišanja augmina dolazi do nastanka svežnjeva koji nisu lateralno vezani na kinetohorna vlakna, a istovremeno da sva kinetohorna vlakna nemaju odgovarajući antiparalelni preklop, potrebno je stanice vizualizirati u boljoj rezoluciji zajedno s obilježavanjem kinetohornih proteina i tubulina pomoću imunocitokemijskog bojanja ili stabilne ekspresije rekombinantnih proteina na koje su vezani fluorescentni biljezi.



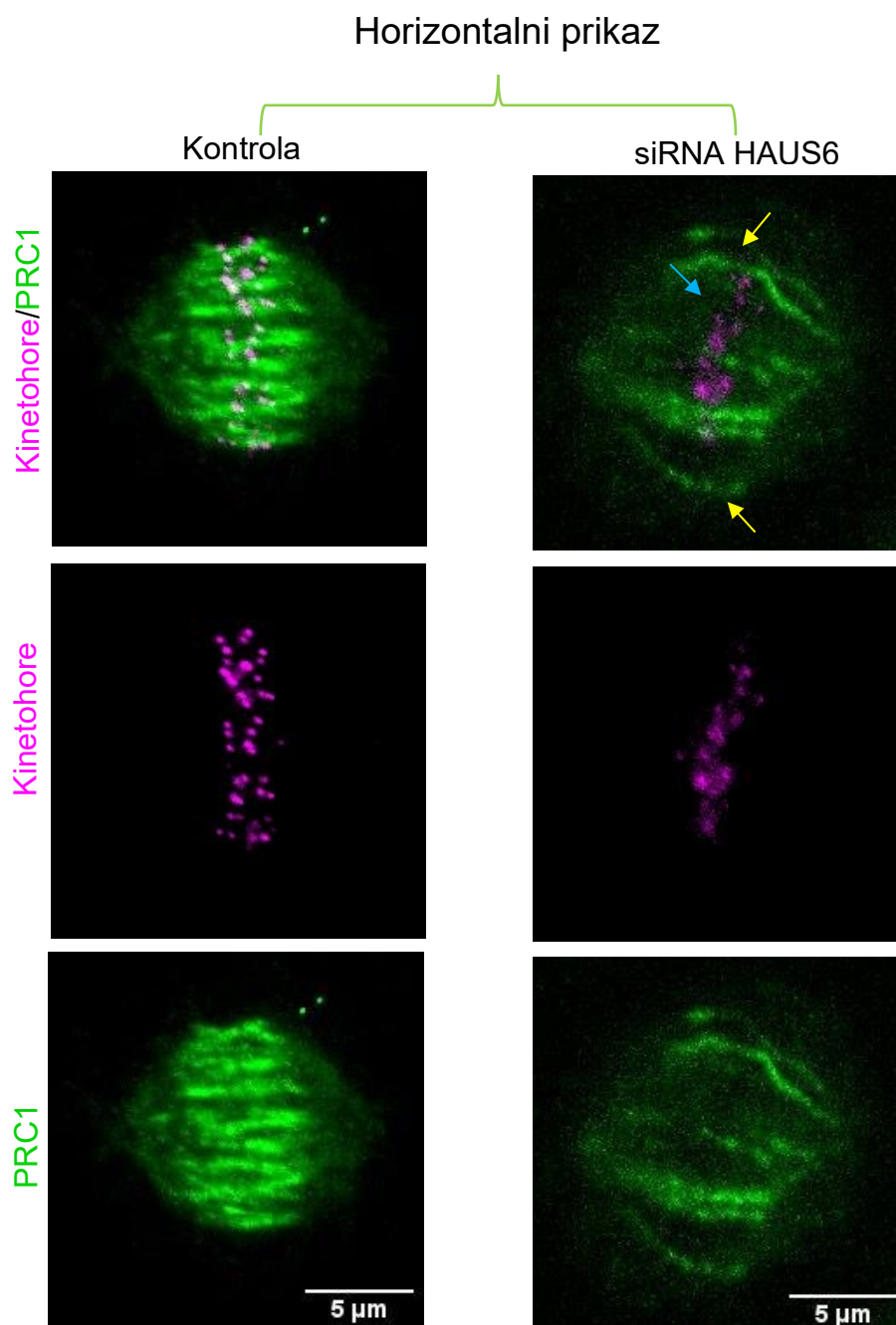
### 4.3. Utišavanje ekspresije augmina u stanicama HeLa centrin1-EGFP CENP-A-EGFP

#### 4.3.1. *Utišavanje ekspresije augmina u stanicama HeLa centrin1-EGFP CENP-A-EGFP daje konzistentne rezultate*

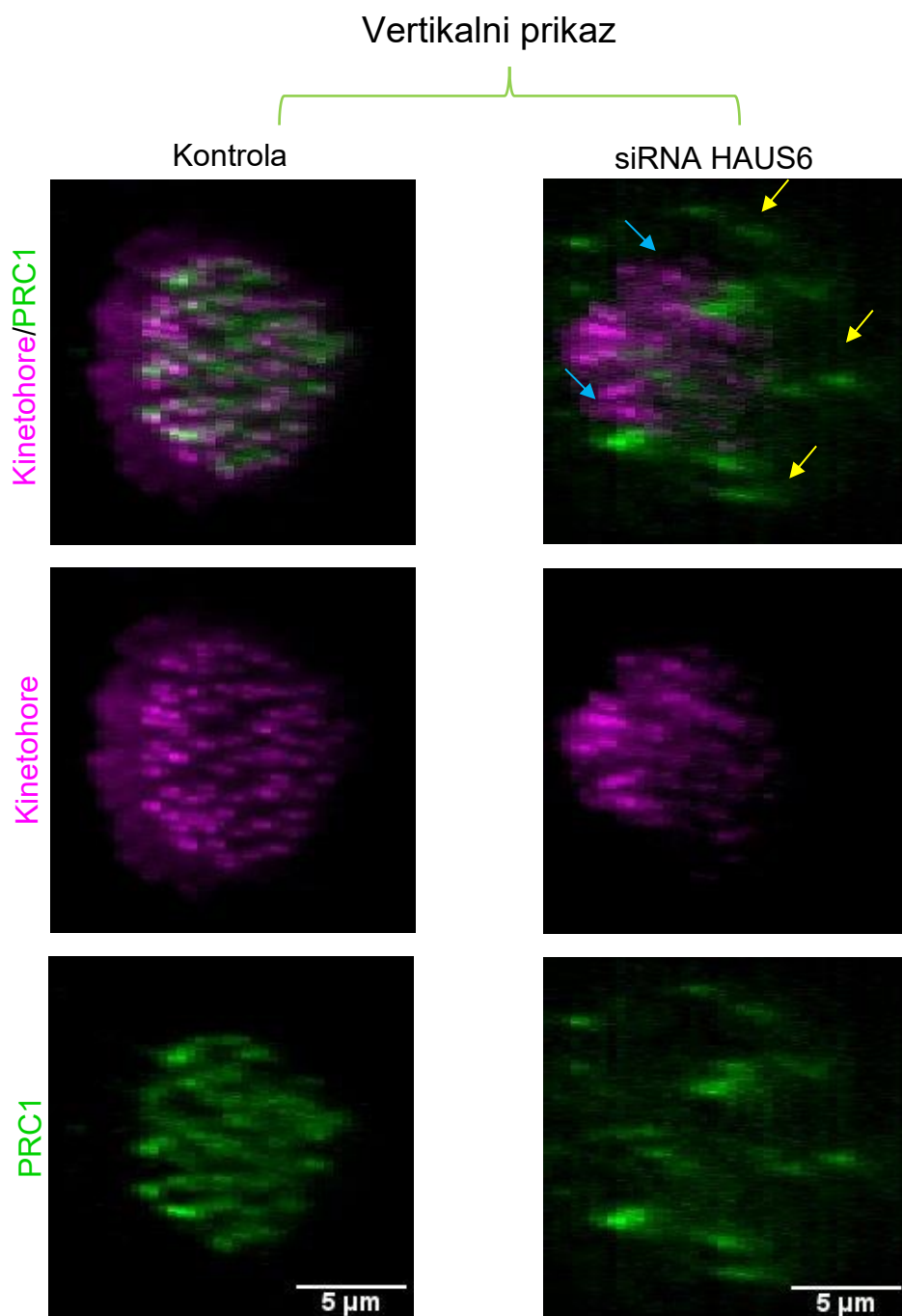
Kako bi se ispitaio odnos premošćujućeg vlakna i kinetohora, stanice HeLa sa stabilnom ekspresijom centrosomskog proteina centrin1-EGFP i kinetohornog proteina CENP-A-EGFP tretirane su s kontrolnom siRNA i siRNA za HAUS6. Potom je imunocitokemijom vizualiziran PRC1-Alexa Fluor 594 (slika 32). Nakon siRNA HAUS6 tretmana vreteno je imalo sličan nepravilni oblik kao kad su tretirane stanice HeLa dt i HeLa PRC-GFP. Nakon transformacije horizontalnog prikaza vretena u vertikalni prikaz (slika 33) uočeno je da dolazi do deformacije vretena, tj. poprečni presjek nije pravilna elipsa kao u HeLa PRC1-GFP, što je vrlo moguće posljedica fiksacije koja može ozbiljno izmijeniti oblik vretena. Da bi se ta pretpostavka potvrdila, računalno su transformirana vretena fiksiranih HeLa PRC1-GFP stanica tretiranih s HAUS6 siRNA i fiksacije metanolom nakon 48 sati. Dobiveni poprečni presjeci nisu pokazivali pravilan prstenasti raspored mikrotubula, te nisu dobivene pravilne elipse.

Na slici 32 moguće je uočiti da u stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 u horizontalnom prikazu postoje kinetohore koje nemaju odgovarajuće interpolarno vlakno obilježeno s PRC1, kao i da postoje vlakna koja nemaju kinetohore. Kako bi se pobliže odredila korelacija položaja kinetohora i antiparalelnih preklopa, ovog puta je računalno transformiran iz horizontalnog u vertikalni prikaz i kanal u kojem su snimljene kinetohore, točnije kinetohorni protein CENP-A-EGFP. U kontrolnim stanicama (slika 33) položaj kinetohora korelirao je s položajem svežnjeva mikrotubula obilježenih s PRC1 što je u skladu s literaturom.<sup>11</sup> U stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 to nije bio slučaj, pa tako postoje kinetohore koje nemaju pripadni antiparalelni preklop, kao i antiparalelni preklopi koji očitno nisu vezani na kinetohorna vlakna. Zanimljivo je i da su u prikazanoj stanici tretiranoj s siRNA HAUS6 kinetohore većinom grupirane na jednu stranu i nije ih moguće razlučiti jednu od druge.

Iako je u stanicama fluorescentno obilježen i centrosom, točnije protein centrin1-EGFP, nije ga moguće uočiti na većini snimki jer ga stanice ekspimiraju značajno manje u odnosu na CENP-A-EGFP. Postavke snimanja bile su podešene prema CENP-A-EGFP jer su za ovaj rad kinetohore od primarnog interesa.



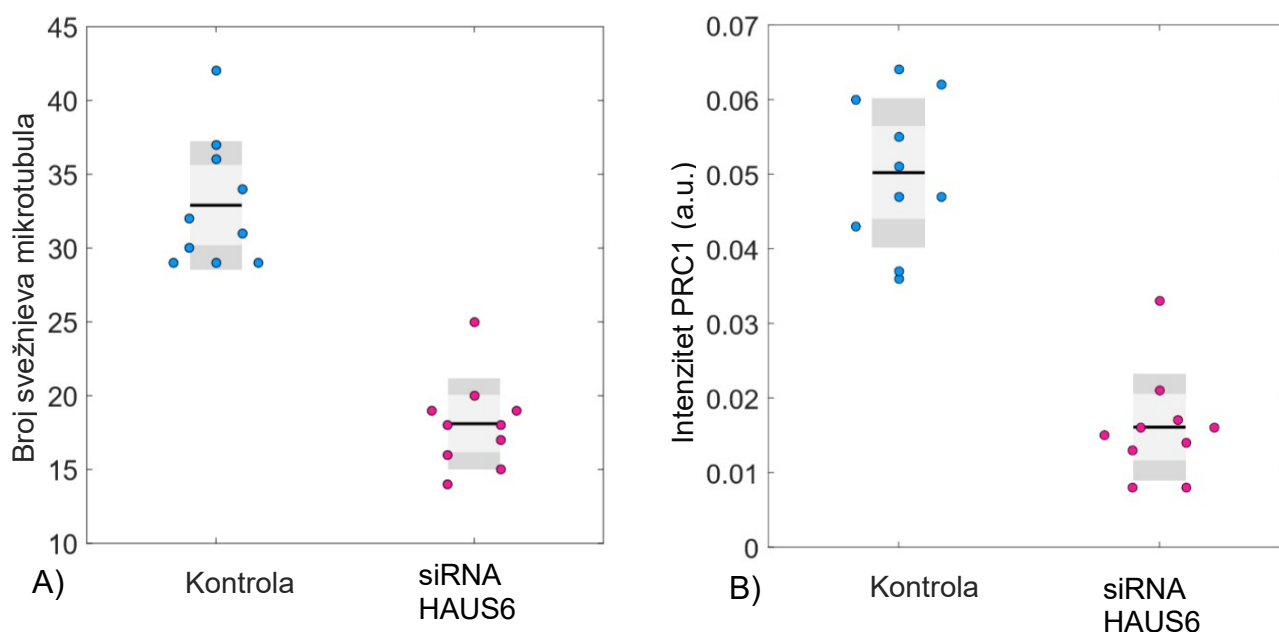
**Slika 32.** Imunocitokemija na stanicama HeLa centrin1-EFGP CENP-A-EGFP fiksiranim 48 h nakon transfekcije. Fluorescentno je obilježen PRC1-Alexa-Fluor-594 nm (zeleno). Prikazana je maksimalna projekcija 5 središnjih ravnina horizontalnog prikaza vretena. Žuta strelica prikazuje antiparalelne preklope bez kinetohora. Plava strelica prikazuje kinetohore bez antiparalelnog preklopa.



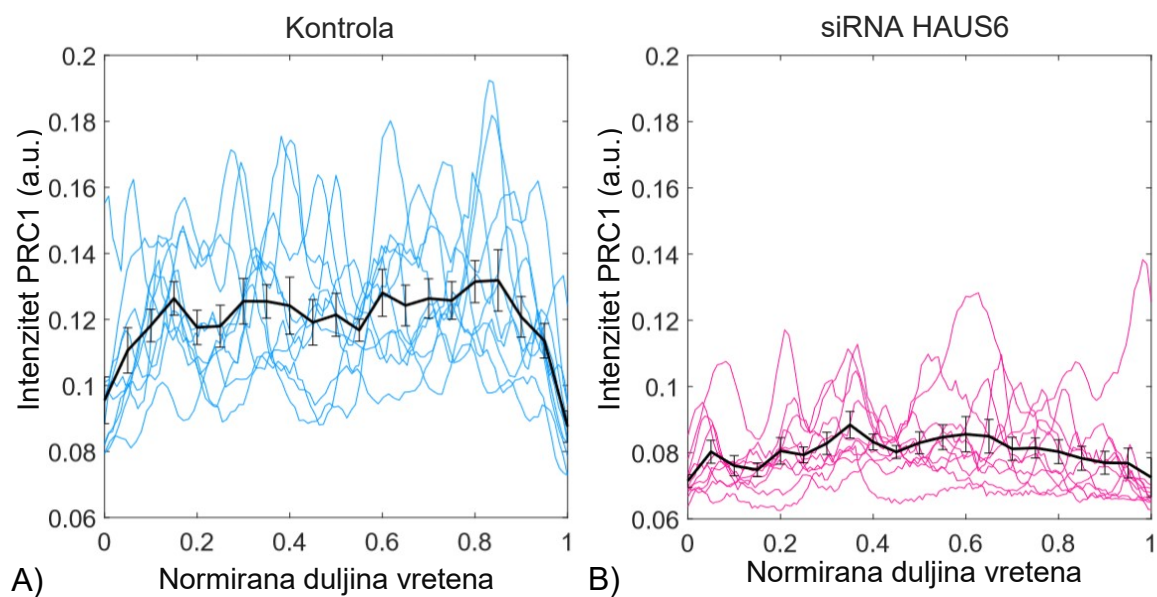
**Slika 33.** Imunocitokemija na stanicama HeLa centrin1-EFGP CENP-A-EGFP fiksiranim 48 h nakon transfekcije. Fluorescentno je obilježen PRC1-Alexa-Fluor-594 nm (zeleno). Prikazan je poprečni presjek vertikalnog prikaza vretena, točnije maksimalna projekcija ravnina u kojima je moguće uočiti kinetohore. Žuta strelica prikazuje antiparalelne preklape bez kinetohora. Plava strelica prikazuje kinetohore bez antiparalelnog preklopa.

I u stanicama HeLa centrin1-EFGP CENP-A-EGFP dolazi do smanjenja broja mikrotubula kao u stanicama HeLa dt i HeLa PRC1-GFP nakon utišavanja ekspresije augmina. U kontrolnim stanicama izbrojeno je ( $33 \pm 1$ ), a u stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 izbrojeno je ( $18 \pm 1$ ) svežnjeva mikrotubula na kojima lokalizira PRC1 (slika 34).

Također, konzistentno je i smanjenje ukupnog signala PRC1 u poprečnom presjeku vretena u stanicama koje ne mogu ekspimirati augmin. U kontrolnim stanicama prosječni signal bio je ( $0,050 \pm 0,003$ ) a.u., a u stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 prosječni signal bio je ( $0,016 \pm 0,002$ ) a.u. Profil intenziteta signala po vertikalnoj osi u poprečnom presjeku vretena (slika 35) također pokazuje manji intenzitet u stanicama tretiranim s siRNA HAUS6, ali nije moguće zamijetiti pad u središtu kao kod stanica HeLa PRC1 GFP što se pripisuje utjecaju fiksacije. Da bi se dodatno ispitalo je li pojava svežnjeva mikrotubula pretežito u prstenu fenotip koji je moguće vidjeti samo u stanicama HeLa PRC1 GFP, a ne i u drugim staničnim linijama, trebalo bi snimiti žive stanice drugih linija s fluorescentno obojenim PRC1 putem stabilne ekspresije ili transfekcijom s plazmidom koji nosi takav gen. Snimanjem živih stanica izbjegle bi se negativne posljedice fiksacije.



**Slika 34. Kvantifikacija broja i signala svežnjeva mikrotubula u poprečnom presjeku vretena stanica HeLa centrin1-EFGP CENP-A-EGFP.** A) Broj zasebnih svežnjeva mikrotubula ( $p = 6 \times 10^{-8}$ ,  $N = 10$ ) B) Intenzitet signala svežnjeva obilježenih s PRC1-Alexa Fluor-594 u poprečnom presjeku vretena. ( $p = 6 \times 10^{-6}$ ,  $N = 10$ )



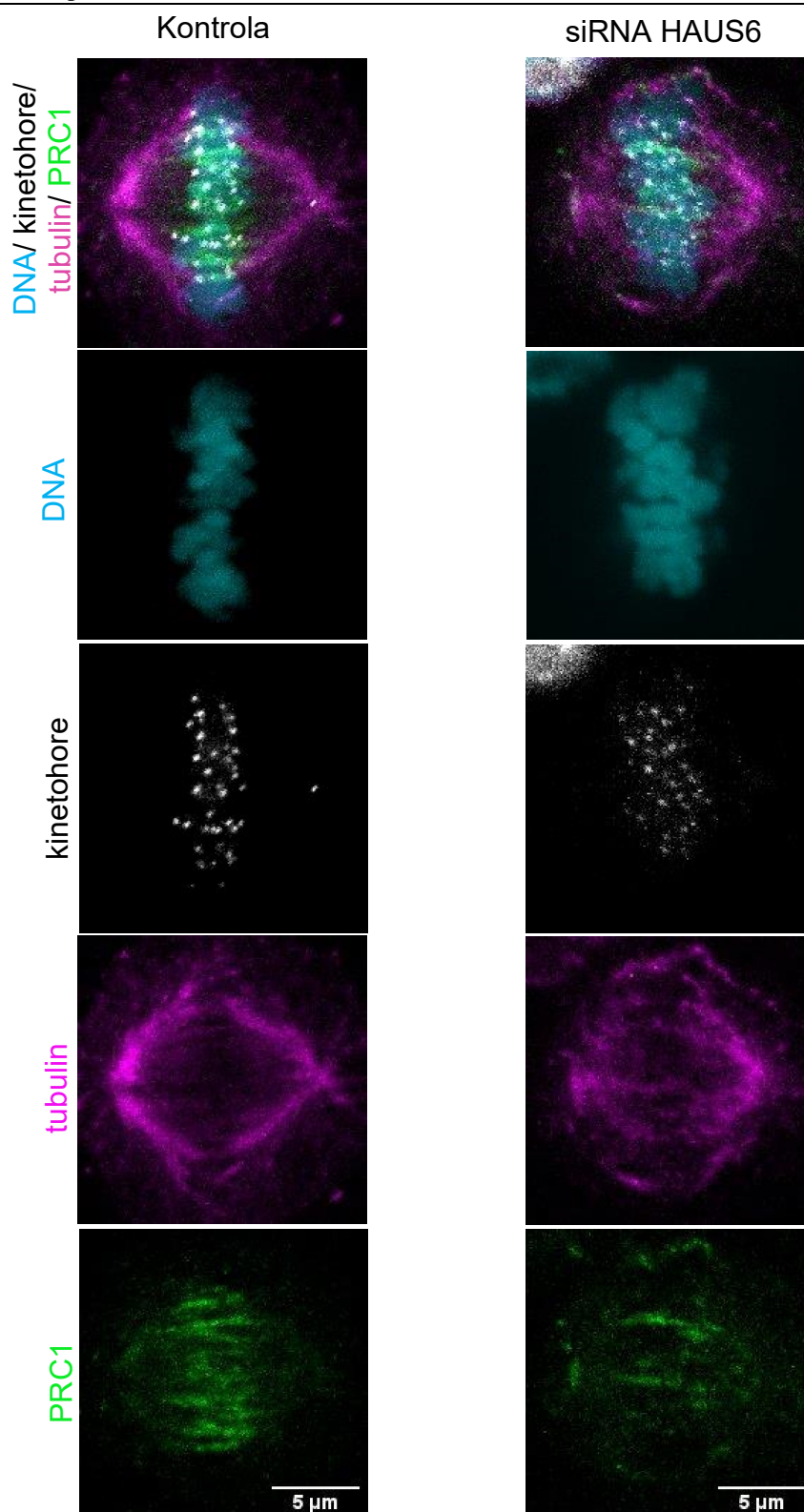
**Slika 35. Profil intenziteta signala u poprečnom presjeku vretena.** A) Kontrolne stanice. B) Stanice tretirane s siRNA HAUS6. Debela crna linija je srednja vrijednost, a vertikalne crne linije su SEM (N = 10).

#### 4.3.2. *Nukleacija mikrotubula posredovana augminom jedan je od mehanizama nastanka premošćujućih vlakana u diobenom vretenu*

Dosada prikazani rezultati pokazuju da prilikom utišavanja ekspresije augmina u stanici i time sprječavanja nukleacije novih mikrotubula na već postojećima dolazi do značajne promjene u broju i duljini antiparalelnih preklopa. Antiparalelni preklopi mogu se lateralno vezati za kinetohore i tako činiti premošćujuća vlakna.

U cilju preciznijeg određivanja međusobnog odnosa kinetohora, kinetohornih vlakana i antiparalelnih preklopa, stanice HeLa centrin1-EFGP CENP-A-EGFP su 48h nakon transfekcije fiksirane i napravljena je imunocitokemija za proteine  $\alpha$ -tubulin i PRC1. DNA je također obilježena bojom DAPI. Slika 36 prikazuje primjer kontrolne stanice i stanice tretirane s siRNA HAUS6. U odnosu na prethodni eksperiment gdje je korištena ista stanična linija i isto primarno antitijelo za PRC1, razlučivost zasebnih antiparalelnih preklopa puno je manja.

Moguće da je do lošijeg signala došlo zbog steričkih smetnji u vezanju dvaju sekundarnih antitijela na primarna antitijela na proteinima od interesa. Antitijela su velike strukture ( $\sim 150$  kDa<sup>52</sup>), a PRC1 i tubulin su u bliskoj interakciji<sup>9</sup>. Moguće je da bi drugom kombinacijom antitijela dobivene slike bile bolje rezolucije. Efektivno su u stanici 4 molekule od interesa obilježene fluorescentnim bojama, od čega dvije imunocitokemijskim postupkom, te je jasno da je riječ o zahtjevnom eksperimentu za kojeg je potrebna duga optimizacija.



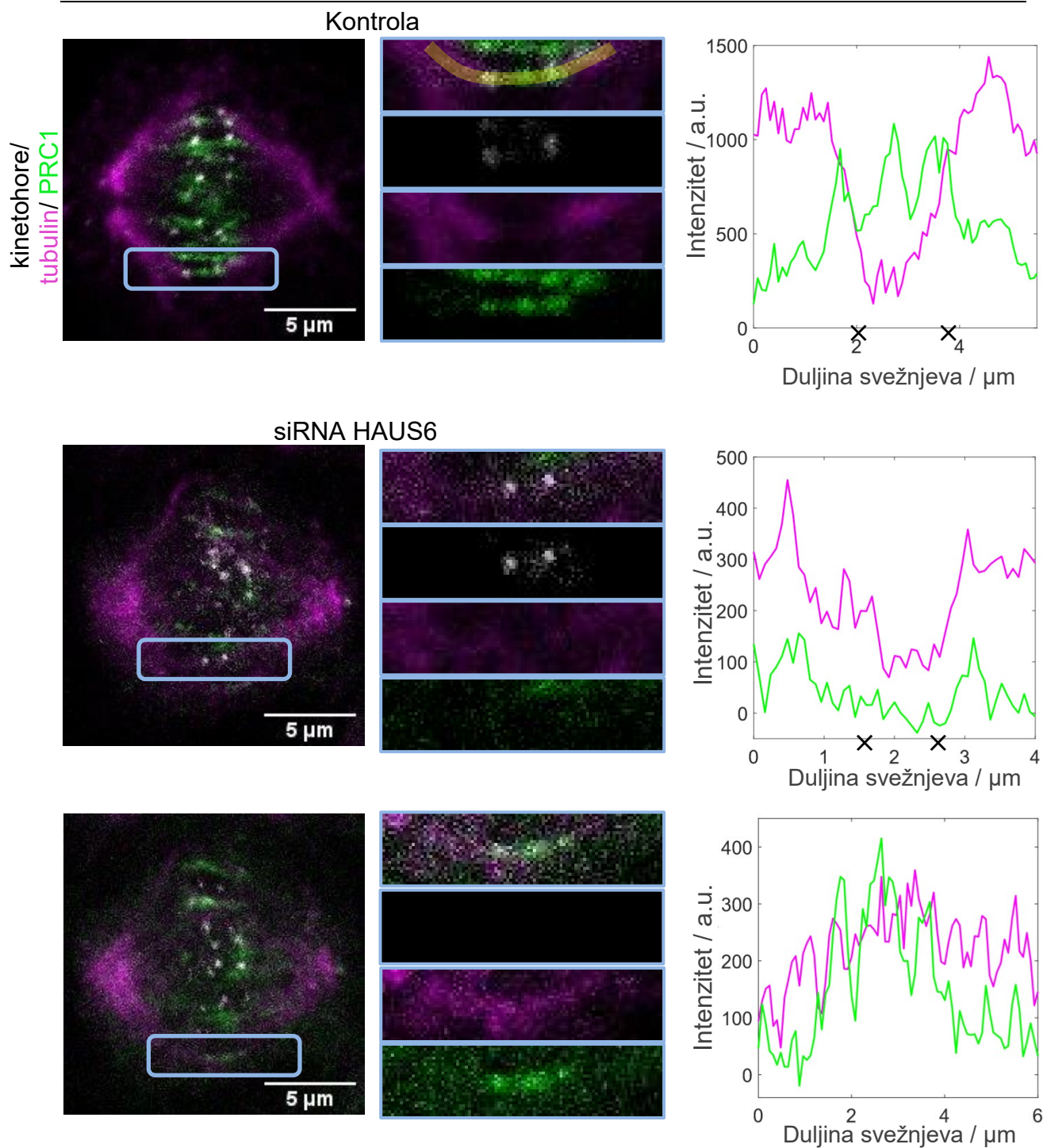
**Slika 36.** Imunocitokemija na stanicama HeLa centrin1-EFGP CENP-A-EGFP fiksiranim 48 h nakon transfekcije. Fluorescentno su obilježeni DNA-DAPI (plavo),  $\alpha$ -tubulin-Alexa Fluor-594 nm (ljubičasto), PRC1-Alexa Fluor-647 nm (zeleno). Prikazana je maksimalna projekcija 5 središnjih ravnina horizontalnog prikaza vretena.

Kako bi se utvrdio odnos kinetohora i vlakana u vretenu, izmjeren je signal intenziteta PRC1 i tubulina unutar jednog svežnja mikrotubula, kao i u eksperimentu analiziranom u odjeljku 4.2.3. Razlika je u tome što se zbog stabilne ekspresije kinetohornog proteina CENP-A moglo jasno znati je li riječ o kinetohornom ili interpolarnom vlaknu.

U kontrolnoj stanici moguće je uočiti svežanj koji se sastoji od kinetohornog vlakna koji je direktno vezan na kinetohore i interpolarnog vlakna povezanog s PRC1 koji čini premošćujuće vlakno (slika 37 A). U stanicama tretiranim s siRNA za HAUS6 je osim takvih svežnjeva moguće uočiti još dva fenotipa: svežanj s kinetohornim vlaknom bez premošćujućeg vlakna (slika 37 B) i svežanj građen samo od interpolarnog vlakna udaljen od središta koji nije vezan na kinetohore (slika 37 C).

Ovim eksperimentom potvrđeni su svi dosadašnji, ali on sam nije dovoljan za interpretaciju podataka zbog loše rezolucije snimki koja se dobije nakon imunocitokemijskog bojanja dva proteina od interesa.



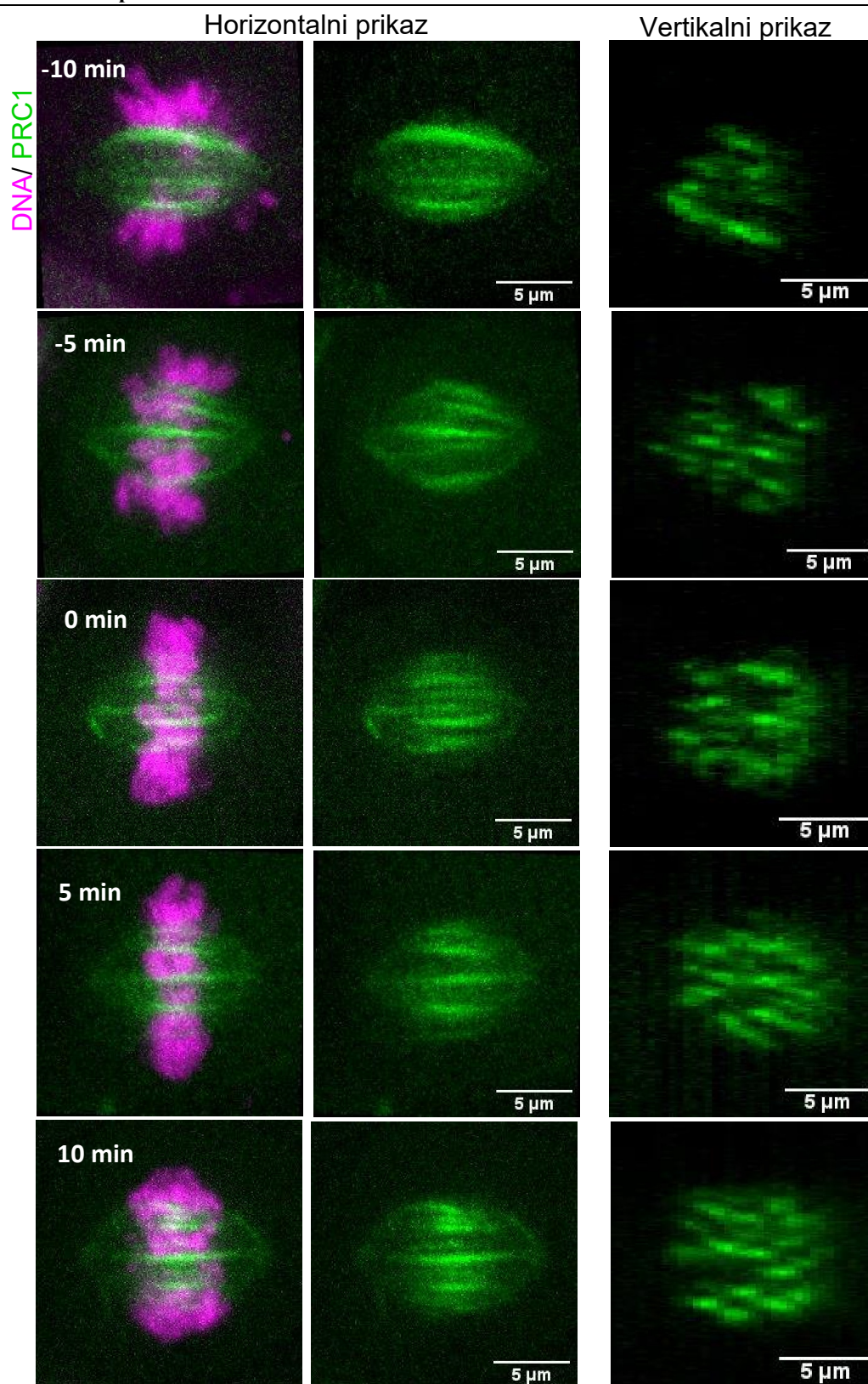


**Slika 37. Kolokalizacija proteina PRC1 i tubulina u centrin1-EFGP CENP-A-EGFP.** Prikazana je suma signala 3 ravnine u kojima je uočen svežanj mikrotubula koji se ne preklapa s drugima. Plavim pravokutnikom označena regija je uvećana 2 puta i prikazani su svi kanali (sredina). Intenziteti PRC1(zeleno) i  $\alpha$ -tubulina (ljubičasto) izmjereni su za svaki svežanj (slike desno), položaj kinetohora označen je crnim križem. A) Kontrolna stanica. B) i C) Stanica tretirana s siRNA HAUS6. B) Svežanj mikrotubula bez premošćujućeg vlakna. C) Svežanj mikrotubula bez kinetohora.

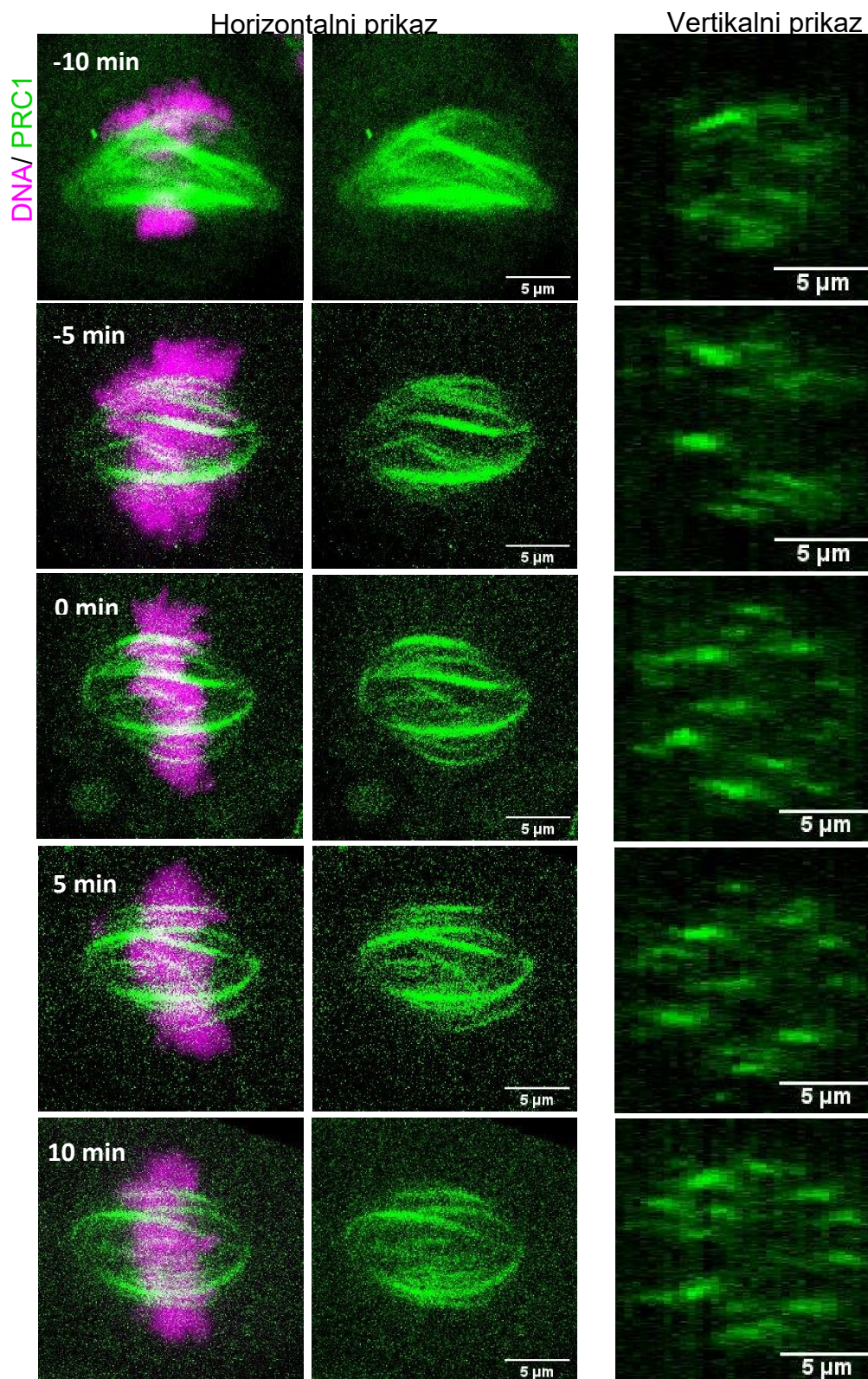
#### 4.4. Dinamika nastanka diobenog vretena u prometafazi u ovisnosti o augminu

Samo diobeno vreteno predmet je brojnih istraživanja i mnoge pojave vezane uz ovu staničnu strukturu još su nepoznate. Jedno od velikih pitanja u području je svakako mehanizam nastanka mikrotubula diobenog vretena. Samo istraživanje je otežano upravo zbog brojnosti mikrotubula u stanici i često se kvantifikacija mikrotubula u stanici svodi na gustoću dobivenu iz profila intenziteta signala<sup>19,42</sup>. Pristup korišten u ovom radu u kojem se iz horizontalnog prikaza vretena pomoću algoritma dobiva vertikalni prikaz i potom analizira slika, pokazao se zadovoljavajućim za preciznu kvantifikaciju svežnjeva mikrotubula u vretenu. U sljedećem dijelu rada snimane su žive stanice u vremenu, od prometafaze do metafaze s ciljem ispitivanja doprinosa mikrotubula nastalih u ovisnosti o augminu uspostavi pravilne metafazne ploče. Stanice HeLa PRC1-GFP s dodanom SiR-DNA za vizualizaciju kromosoma snimane su u vremenskom intervalu od 5 minuta. Snimljen je cijeli volumen vretena. Svaka snimka transformirana je korištenjem algoritma<sup>38</sup> kako bi se dobio vertikalni prikaz vretena. Snimljeno je 5 kontrolnih stanica i 5 stanica tretiranih s siRNA HAUS6. Kontrolne stanice su u periodu snimanja zadovoljile kontrolnu točku za prijelaz iz metafaze u anafazu i segregirale kromosome. Time je pokazano da samo snimanje ne oštećuje stanicu do te mjere da bi utjecalo kontrolnu točku. To nije bio slučaj za tretirane stanice u kojima nije opažena anafaza što je i očekivano prema literaturi jer stanice HeLa mogu biti zaustavljene u metafazi i do 3 sata kada im je utišana ekspresija augmina<sup>15-17</sup>.

Također, jedan od problema bio je efekt fotoizbljeđivanja (eng. *photobleaching*) jer dolazi do degradacije fluorofora i smanjenja intenziteta signala uslijed dugotrajne pobude. Koliko će fotoizbljeđivanje utjecati, ovisi o duljini snimanja, jačini lasera i broju ravnina vretena koje se snimaju. Budući da je za dobivanje kvalitetnih slika nakon transformacije u vertikalni prikaz nužan što bolji signal prilikom snimanja vretena u horizontalnom prikazu, postavke su bile podešene tako da je do fotoizbljeđivanja došlo već nakon 20-30 min i tada se prestalo sa snimanjem stanica. Jedna od 5 stanica za kontrolni i tretirani uzorak u vremenskim razmacima prikazana je u horizontalnom i vertikalnom prikazu na slikama 38 i 39. Vrijeme do uspostave metafazne ploče prikazano je s negativnim predznakom.



**Slika 38. Kontrolna stanica HeLa PRC1-GFP (zeleno) SiR-DNA (ljubičasto).** Stanica je snimana svakih 5 minuta. Prikazana je maksimalna projekcija središnjih 5 ravnina. Desno je suma 10 središnjih ravnina vertikalnog prikaza dobivenog transformacijom horizontalnog prikaza. Skala je 5 µm.

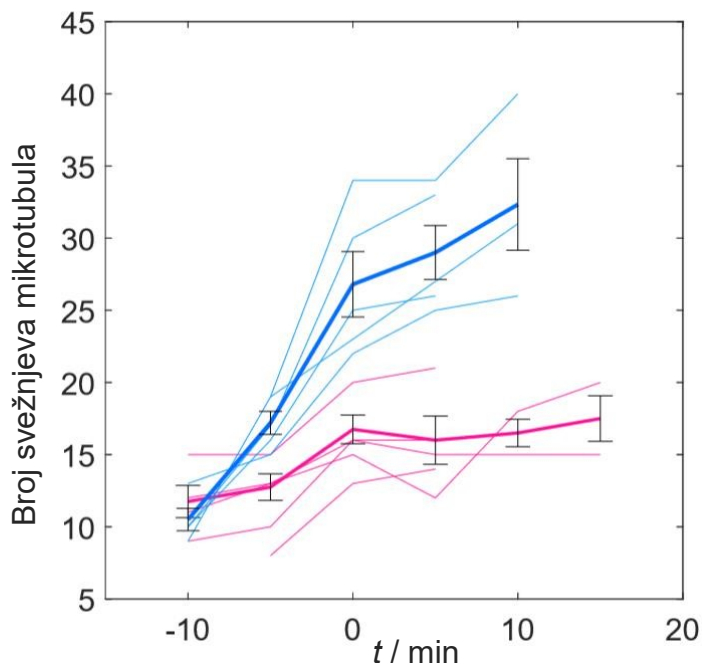


**Slika 39.** Stanica HeLa PRC1-GFP (zeleno) SiR-DNA (ljubičasto) tretirane s siRNA HAUS6. Stanica je snimana svakih 5 minuta. Prikazana je maksimalna projekcija središnjih 5 ravnina. Desno je suma 10 središnjih ravnina vertikalnog prikaza dobivenog transformacijom horizontalnog prikaza. Skala je 5 μm.

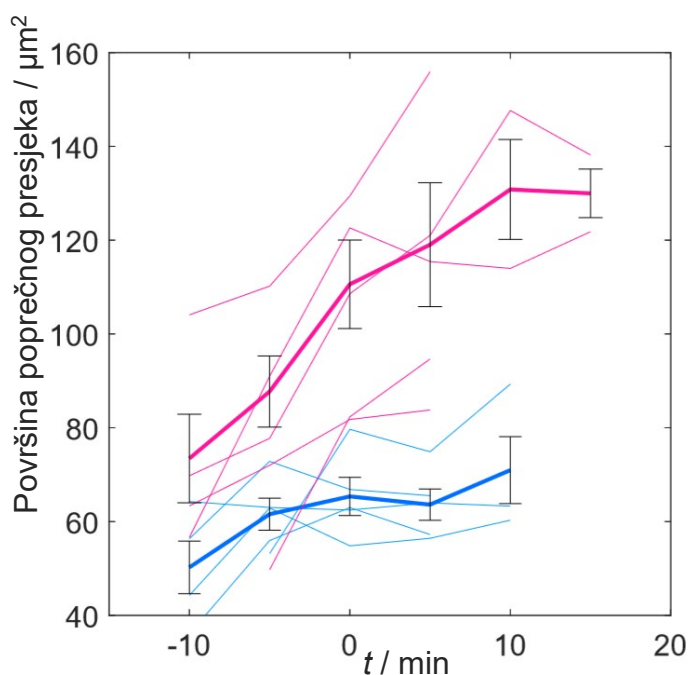
Prilikom transformacije horizontalnog prikaza vretena u vertikalni prikaz uočeno je da u kontrolnim stanicama dolazi do značajnog povećanja broja svežnjeva mikrotubula kako se formira sve pravilnija metafazna ploča. U prometafazi ( $t = -10$  min) je moguće ( $11 \pm 1$ ) odvojenih svežnjeva. Kako se vreteno približava metafazi ( $t = 0$  min) nastaje sve više manjih i pravilnijih svežnjeva i taj broj dosegne ( $27 \pm 2$ ). Ukoliko stanice ne mogu eksprimirati augmin kao što je slučaj u stanicama tretiranim s siRNA HAUS6, ne dolazi do značajne amplifikacije svežnjeva mikrotubula (slika 40). U prometafazi ( $t = -10$  min) je moguće uočiti ( $12 \pm 1$ ) svežnjeva mikrotubula kao i u kontrolnim stanicama, ali do metafaze ( $t = 0$  min) u vretenu nastane svega ( $16 \pm 1$ ) svežnjeva. Dapače, naizgled se vreteno formira samo sa svežnjevima koji su nastali prometafazi.

Prethodno je uočeno da su vretena stanica tretiranih s siRNA HAUS6 u prosjeku veća. Stanicama snimljenim u vremenskim razmacima od 5 minuta izmjereno je poprečni presjek u svakoj vremenskoj točki. Uočeno je da vretena kojima nedostaje augmin značajno rastu (slika 41). Kontrolne stanice u prometafazi ( $t = -10$  min) imaju poprečni presjek površine ( $50 \pm 6$ )  $\mu\text{m}^2$ , a kada se formira metafazna ploča ( $t = 0$  min), površina naraste do ( $65 \pm 4$ )  $\mu\text{m}^2$ . U stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 taj porast je mnogo veći; vrijednosti za iste vremenske intervale odgovaraju u prometafazi ( $71 \pm 8$ )  $\mu\text{m}^2$ , a u metafazi ( $105 \pm 9$ )  $\mu\text{m}^2$ . Zanimljivo je da u vremenu nakon metafaze nastavlja rast poprečnog presjeka vretena do ( $130 \pm 9$ )  $\mu\text{m}^2$ , što nije slučaj u kontrolnim stanicama koje u tom trenutku imaju površinu poprečnog presjeka gotovo istovjetnu kao i u metafazi ( $67 \pm 4$ )  $\mu\text{m}^2$ .

Svežnjevi nastali u prometafazi formiraju prsten koji je uočen prethodno kako nastaje metafazna ploča (slika 39). Do trenutka kad je prekinuto snimanje nijedna stanica nije krenula u anafazu. Prikazana kontrolna stanica (slika 38) u vremenu 10 min je na samom ulasku u anafazu što je u skladu s literaturnim podacima o diobi HeLa stanica i pokazuje da metoda i snimanje ne utječu značajno na samu duljinu diobe, te da je efekt uočen u stanicama tretiranim s siRNA HAUS6 zaista posljedica utišavanja ekspresije augmina.



**Slika 40. Broj zasebnih svežnjeva mikrotubula vretena s obilježenim PRC1-GFP u poprečnom presjeku u stanicama HeLa PRC1-GFP SiR-DNA.** Vremenski razmak u snimanju odgovara 5 minuta. Jedna plava linija prikazuje svaku od kontrolnih stanica, a ružičasta linija svaku od stanica tretiranih s siRNA HAUS6. Debela linija je srednja vrijednost, a vertikalna crna linija standardna greška.



**Slika 41. Površina poporečnog presjeka vretena u stanicama HeLa PRC1-GFP SiR-DNA.** Vremenski razmak u snimanju odgovara 5 minuta. Jedna plava linija prikazuje svaku od kontrolnih stanica, a ružičasta linija svaku od stanica tretiranih s siRNA HAUS6. Debela linija je srednja vrijednost, a vertikalna crna linija standardna greška.

Sam mehanizam nastanka svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu zasad je nepoznat. Moguće je da dolazi do odvajanja zasebnih svežnjeva iz velikih svežnjeva mikrotubula kako se pojedini vežu na kinetohore i time stabiliziraju. Također, moguće je da su pojedini mikrotubuli nastali iz potpuno novih centara nukleacije. Novi mikrotubuli mogu nastati na centrosomu, ali i neovisno o istom. Dokazano je da nastaju na kalupu  $\gamma$ -tubulinskom prstenastom kompleksom u blizini kinetohora u ovisnosti o kromatinu ili iz već postojećih mikrotubula u ovisnosti o augminu<sup>14,22,42</sup>. Budući da je ovim radom pokazano da utišavanje augmina smanjuje broj nastalih svežnjeva mikrotubula od prometafaze do metafaze, ali da se metafazna ploča ipak može formirati, moguće je da su mikrotubuli nastali u ovisnosti o augminu ključni za faze koje slijede nakon metafaze.

Ukoliko je augmin utišan, stanica nakon velikog odgađanja (više od 3h)<sup>15-17</sup> ipak može zadovoljiti kontrolnu točku na prijelazu iz metafaze u anafazu, ali 9/10 stanica neće moći završiti citokinezu i dogodit će se apoptoza. Razlog tome smanjenje broja mikrotubula nastalih neovisno o centrosomu u središnjem djelu vretena. Smatra se da su upravo ti mikrotubuli oni koje PRC1 poveže kako bi nastalo centralno tijelo<sup>44</sup>. Također, antiparalelni preklopi u premošćujućem vlaknu smicanjem putem motornih proteina odvajaju sestrinske kinetohore, što je važan doprinos dosada poznatim mehanizmima u anafazi<sup>7</sup>. Utišavanje augmina utječe na debljinu premošćujućeg vlakna koje održava tenziju između sestrinskih kinetohora<sup>4</sup>. Ukoliko tenzija nije uravnotežena na obje sestrinske kinetohore, neće doći do anafaze<sup>1,45</sup>. Za pravovremenu i pravilnu diobu ključno je da vreteno ima 30 i više svežnjeva antiparalelnih mikrotubula kojima se broj povećava od prometafaze do metafaze. Jedan od bitnih faktora za amplifikaciju mikrotubula do zadovoljavajućeg broja svakako je proteinski kompleks augmin.

Ovaj rad omogućio je detaljnije objašnjenje doprinosa nukleacije mikrotubula putem augmina formiranju funkcionalnog diobenog vretena. Samo pitanje nastanka diobenog vretena i detaljnog objašnjenja svih mehanizama koji doprinose tom procesu i dalje ostaje otvoreno u polju. Kako bi se ispitao točan proces nastanka vretena korištenjem fluorescencijske mikroskopije proteina od interesa potrebno je podesiti postavke snimanja tako da vrijeme između snimki bude što kraće i snimanje što brže. Također, potrebno je smanjiti utjecaj fotoizbljeđenja kako bi se spriječila denaturacija proteina od interesa i time dobile kvalitetnije slike.

Dosada su otkriveni brojni proteini koji imaju ključnu ulogu u nukleaciji novih mikrotubula neovisno o centrosomu<sup>16</sup>. Kako bi se saznao doprinos svakog mehanizma nastanku diobenog vretena, potrebno je ispitati svaki od njih. Ono što otežava ovakva

---

istraživanja, a biološki je iznimno bitno, je što stanica gotovo uvijek ima komplementarni mehanizam putem kojeg svejedno dođe do diobe, posebno kada je riječ o RNAi tretmanima koji traju u prosjeku 48h<sup>26</sup>.

---



## § 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ciljno je utišana ekspresija proteina HAUS6, bitne podjedinice kompleksa augmina koji time nije funkcionalan u diobenom vretenu. Utjecaj na diobeno vreteno praćen je vizualizacijom proteina PRC1, ključnog za formiranje svežnjeva mikrotubula. U svim staničnim linijama, snimljenim bilo dok su stanice žive ili fiksirane, uslijed utišavanja ekspresije augmina dolazi do nastanka deformiranih diobenih vretena; ona su duža i šira za 1,2 puta, te imaju 2 puta veći antiparalelni preklap.

U živim stanicama moguće je uočiti da u poprečnom presjeku vertikalnog prikaza vretena nema svežnjeva mikrotubula. Time je dokazano da je augmin ključan za amplifikaciju mikrotubula u središnjem dijelu vretena putem grananja novih mikrotubula na već postojećima. Dobiveni rezultati upućuju da se u sredini poprečnog presjeka nalaze kromosomi pričvršćeni putem kinetohora na mikrotubule, ali da nemaju premošćujuća vlakna. Mehanizam nukleacije novih mikrotubula putem augmina je potencijalno ključan za amplifikaciju antiparalelnih svežnjeva koji se lateralno vežu na kinetohore i čine premošćujuća vlakna. Svakako je potrebno dodatno istražiti ulogu velikih antiparalelnih preklopa u stanicama koje ne mogu eksprimirati augmin.

Specifični fenotip u kojem u središtu diobenog vretena nema antiparalelnih svežnjeva obilježenih s PRC1 ako nema ekspresije augmina nastaje u postupno dok se formira vreteno. Svežnjevi mikrotubula nastali u prometafazi s vremenom se udaljavaju iz središta i tvore prsten u poprečnom presjeku, te ukupan broj svežnjeva u danom vremenu ne dosegne broj svežnjeva u kontrolnim stanicama. Amplifikacija mikrotubula posredovana augminom ključan je mehanizam za formiranje pravilnog i funkcionalnog vretena tijekom čitave mitoze.

---

## § 6. 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. N. Pavin, I. M. Tolić, *Annu. Rev. Biophys.* **45** (2016) 279-298.
  3. I.M. Tolić, *Eur Biophys J* **47** (2018), 191-203.
  4. 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.
  5. K. L. McDonald, E. T. O'Toole, D. N. Mastronarde, J. R. McIntosh, *J Cell Biol.*, **118** (1992) 369-383.
  6. R. Ohi, M. L. Coughlin, W. S. Lane, T. J. Mitchison, *Dev. Cell.*, **5** (2003) 309-321.
  7. K. Vukušić, R. Buđa, A. Bosilj, A. Milas, N. Pavin, I. M. Tolić, *Dev. Cell.*, **43(1)** (2017) 11-23.
  8. C. E. Walczak, S. L. Shaw, *Cell* **142(3)** (2010) 364-367.
  9. R. Subramanian, S. C. Ti, L. Tan, S. A. Darst, T. M. Kapoor, *Cell* **154** (2013) 377-90.
  10. P. Bieling, I. A. Telley, T. Surrey, *Cell*, **142** (2010) 420-432.
  11. B. Polak, P. Risteski, S. Lesjak, I. M. Tolić, *EMBO Rep.*, **18(2)** (2017) 217-230.
  12. C. Mollinari, J. Klemen, W. Jiang, G. Schoehn, T. Hunter, R. L. Margolis, *J Cell Biol.*, **157(7)** (1993) 1175-1186.
  13. T. Mitchison, M. Kirschner, *Nature*, **312** (1984) 237-242.
  14. S. Petry, *Annu Rev Biochem.*, **85** (2016) 659-683.
  15. G. Goshima, M. Mayer, N. Zhang, N. Stuurman, R. D. Vale, *J Cell Biol.*, **181(3)** (2008), 421-429.
  16. S. Lawo, M. Bashkurov, M. Mullin, M. G.Ferreria, R. Kittler, B. Habermann,
-

- A.Tagliaferro, I. Poser, J. R. A. Hutchins, B. Hegemann, D. Pinchev, F. Buchholz, Jan-M. Peters, A. A. Hyman, A.-C. Gingras, L. Pelletier, *Curr Biol.*, **19(10)** (2009), 816-826.
17. R. Uehara, R. S. Nozawa, A. Tomioka, S. Petry, R. D. Vale, C. Obuse, G. Goshima, *PNAS*, **106(17)** (2009) 6998-7003.
18. T. Kamasaki, E. O'Toole, S. Kita, M. Osumi, J. Usukura, J. R. McIntosh, G. Goshima, *J Cell Biol.*, **202(1)** (2013) 25-33.
19. S. Petry, A. C. Groen, K. Ishihara, T. J. Mitchison, R. D. Vale, *Cell* **152(4)** (2013) 768-777.
20. K.-C. Hsia, E. M. Wilson-Kubalek, A. Dottore, Q. Hao, K.-L. Tsai, S. Forth, Y. Shimamoto, R. A. Milligan, T. M. Kapoor, *Nat Cell Biol.*, **16(9)** (2014) 852-863.
21. J.-G. Song, M. R. King, R. Zhang, R. S. Kadzik, A. Thawani, S. Petry, *J Cell Biol.*, **217(7)** (2018) 2417-2428.
22. C. A. Tovey, P. T. Conduit, *Essays Biochem.*, **62(6)** (2018) 765-780.
23. N. Lecland, J. Luders, *Nat Cell Biol.*, **16(8)** (2014) 770-778.
24. D. P. Bartel, *Cell Press*, **116** (2004) 281-297.
25. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th edition, W. H. Freeman and company, New York, 2013 1081.-1085.
26. S. Saurabh, A. S. Vidyarthi, D. Prasad, *Planta* **239** (2014) 543–564.
27. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/> (datum pristupa 15.3.2019.)
28. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-cultur10-basics/transfection-basics.html> (datum pristupa 15.3.2019.)
29. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th edition, W. H. Freeman and company, New York, 2013 529-562.
30. J. C. Waters, T. Wittmann, *Methods Cell Biol.*, **123** (2014) 1-16.
31. S. Onur, A. T. Saurin, J. M. G. Higgins, *Sci Rep*, **8(1)** (2018) 7898.
32. O. V. Stepanenko, V. V. Verkhusha, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky, K. K.
-

- Turoverov, *Curr Protein Pept Sci.*, **9(4)** (2008) 127-135.
33. M. Ormö, A.B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science*, **273(5280)** (1996) 1392–5.
34. <https://www.rcsb.org/structure/1gfl> (datum pristupa 16.3.2019.)
35. <https://microscopy.duke.edu/guides/intro-sampl10-prep-immunofluorescence> (datum pristupa 16.3.2019.)
36. M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M.D. Bootman, *Cold Spring Harb Protoc* **10** (2014) 526-541.
37. I. Poser, M. Sarov, J. R. A. Hutchin, J.-K. Hérich, Y. Toyoda, A. Pozniakovsky, D. Weigl, A. Nitzsche, B. Hegemann, A. W. Bird, L. Pelletier, R. Kittler, S. Hua, R. Naumann, M. Augsburg, M. M. Sykora, H. Hofemeister, Y. Zhang, K. Nasmyth, P. Kevin, K. White, S. Dietzel, K. Mechtler, R. Durbin, A. F. Stewart, J.-M. Peters, F. Buchholz, A. A. Hyman, *Nat Methods* **5(5)** (2008) 409-415.
38. M. Novak, B. Polak, J. Simunić, Z. Boban, B. Kuzmić, A. W. Thomae, I. M. Tolić, N. Pavin, , *Nat. Commun.* **9(3571)** (2018) 1-10.
39. J. S. Tirnauer, J.C. Canman, E.D. Salmon, T. J. Mitchison, *Mol Biol Cell.* **13** (2002) 4308–4316.
40. N. M. Mahoney, G. Goshima, A.D. Douglass, R.D. Vale, *Curr Biol.* **16** (2006) 564–569.
41. <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/54243-univarscatter> ((datum pristupa 16.3.2019.)
42. S.L. Prosser, L. Pelletier, *Mol Biol Cell.* **13** (2017) 187-201.
43. V. Magidson, A. Khodjakov, *Methods Cell Biol.*, (2013) 1-15.
44. R. Uehara, T. Kamasaki, S. Hiruma, I. Poser, K. Yoda, J. Yajima, D. W. Gerlich, G. Goshima, *Mol Biol Cell.* **27(5)** (2016) 812–827
45. L. Nezi, A. Musacchio, *Curr. Opin. Cell Biol.* **21** (2009) 785-795.
46. J.F. Díaz, R. Strobe, Y. Engelborghs, A. A. Souto, J. M. Andreu, *J Biol Chem.* (2002) **275(34)** 26265-76.
47. G. Lukinavičius, L. Reymond, E. D'Este, A. Masharina, F. Göttfert, H. Ta, A.
-

Güther, M. Fournier, S. Rizzo, H. Waldmann, C. Blaukopf, C. Sommer, D. W. Gerlich, D. H. Arndt, S. W. Hell, K. Johnsson, *Nat. Methods* (2014) **11(7)** 731-733.

48. J. Simunić, I. M. Tolić, *Trends Biochem. Sci.* (2016)

49. U. Vielkind, S. H. Swierenga, *Histochem.* **91** (1989) 81-88.

50. R. W. M. Hoetelmans, F. A. Prins, I. C. Velde, J. Van der Meer, C. J. H. Van de Velde, J. H. Van Dierendonck, *Appl. Immunohisto.* **9** (2001) 346-351.

51. A. J. Hobro, N. I. Smith, *Vib. Spectros.* **91**(2017) 31-45.

52. G. M. Edelman, B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser, M. J. Waxdal, *PNAS* (1969) 78-85.

53. G. Goshima, R. Uehara, *J Cell Biol.* **191(2)** (2010) 259-26

---

---

---

## Zahvale

*Hvala prof. dr. sc. Ivi Tolić na ukazanom povjerenju i što je od prvog dana vjerovala u moj rad. Velika je čast i privilegija učiti od Vas, Vaš entuzijizam, pozitivan stav i široki osmijeh motivacija su da nastavim.*

*Hvala dr. sc. Juraju Simuniću na pomoći oko izrade ovog rada, svim savjetima i podršci kad god je zapelo.*

*Hvala doc. dr. sc. Morani Dulić na svim prijedlozima i konstruktivnim kritikama koje su pomogle oblikovati ovaj rad.*

*Hvala svim djelatnicima Kemijskog odsjeka PMF-a na svemu naučenom, kao i na motivaciji da od 'malih nogu' krenemo znanstvenim vodama.*

*Hvala cijelom Tolić labu na ugodnoj radnoj atmosferi, spontanim i konstruktivnim diskusijama, te brizi da uvijek ima kave i nečeg slatkog. Osobito hvala mojim brižnim laboskim mamama Ivani i Sonji što su mi pomogle da posložim prioritete i što uz njihovo 'Moraš jesti!' nikad nisam mikroskopirala na prazan želudac.*

*Hvala izv. prof. dr. sc. Nenadu Pavinu i svim teoretičarima na savjetima i drugoj perspektivi koju su dali ovom radu.*

*Hvala mojoj doktorandici Mihi što je uz puno strpljenja za moju šlampavost prošla sa mnom kroz osnove, od pipete do okulara, kad nisam znala prepoznati gledam li u stanicu ili poklopac.*

*Hvala Hrvoju, svim prijateljima i obitelji na podršci i razumijevanju, a najviše hvala Majki i Ćaći što su od malena bili uz mene i podržavali me u svim mojim željama i odlukama, koliko god se ponekad činile blesave i nemoguće. Zbog vas sam to što jesam, nadam se da vam je na ponos.*

---



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

## SAŽETAK

### **Nukleacija novih svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu putem proteinskog kompleksa augmina**

Martina Manenica

Na početku stanične diobe, eukariotska stanica formira diobeno vreteno, molekularnu strukturu čija je uloga jednaka raspodjela kromosoma među stanicama kćerima. Diobeno vreteno građeno je od mikrotubula i pripadnih proteina. Na koji način nastaje vreteno u ranoj mitozu nije do kraja istraženo, no jedan od poznatih mehanizama u kasnijoj mitozu je mehanizam nastanka novih mikrotubula na već postojećima u ovisnosti o proteinskom kompleksu augminu.

U ovom radu ciljano je utišana ekspresija proteina HAUS6, bitne podjedinice proteinskog kompleksa augmina u svrhu ispitivanja njegove uloge u nastanku svežnjeva mikrotubula u ranim fazama mitoze u humanim stanicama. Korištene su humane tumorske stanice HeLa divljeg tipa, HeLa PRC1-GFP i HeLa centrin1-EGFP CENP-A-EGFP. Vizualizirani protein od interesa bio je protein regulator citokineze 1, PRC1 koji povezuje mikrotubule u svežnjeve. Također, korištenjem fluorescentnih kemikalija i antitijela vizualizirani su DNA i tubulin. Žive i fiksirane stanice su snimljene konfokalnim fluorescentnim pretražnim mikroskopom, a radi dobivanja više informacija o arhitekturi vretena, vretena snimljena u horizontalnom prikazu računalno su transformirana u vertikalni prikaz i analizirana.

Uslijed utišavanja ekspresije augmina došlo je do značajnih promjena u fenotipu vretena. Diobeno vreteno je bilo veće, a broj svežnjeva mikrotubula manji. Također, značajno se promijenio raspored mikrotubula na način da su tvorili prsten u poprečnom presjeku vretena. Broj mikrotubula u stanicama koje su imale augmin narastao je dvostruko od prometafaze do metafaze, u odnosu na stanice u kojima je ekspresija augmina utišana. Time je pokazano da je proteinski kompleks augmin ključan faktor za amplifikaciju mikrotubula u ranoj mitozu koji potom doprinose pravilnom obliku i funkciji diobenog vretena.

Ključne riječi: augmin, diobeno vreteno, metafaza, mikrotubuli, prometafaza

---





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

## **ABSTRACT**

### **Augmin-dependent nucleation of new microtubule bundles in mitotic spindle**

Martina Manenica

Mitotic spindle is a molecular structure formed by the eukaryotic cell in the beginning of cell division. Its main role is the proper segregation of chromosomes between two daughter cells. Mitotic spindle is made of microtubules and associated proteins. It remains largely unknown how it is generated in early mitosis. However, one of the known mechanisms in late mitosis is an augmin-dependent mechanism where new microtubules grow on the walls of pre-existing microtubules.

To get insight into the role of augmin complex in the formation of microtubule bundles in early mitosis, knockdown of its subunit HAUS6 was carried out in human tumor cell lines. HeLa wild type, HeLa PRC1-GFP and HeLa centrin1-EGFP CENP-A-EGFP were used. Protein regulator of cytokinesis, PRC1, which is responsible for microtubule bundling, was visualized. Also, DNA and tubulin were visualized by using fluorescent chemicals and specific antibodies. Live and fixed cells were imaged by confocal fluorescent laser-scanning microscope. To acquire more information about spindle architecture, horizontally imaged spindles were computationally transformed to vertical view and analysed afterwards.

When augmin had been knocked down, the spindle phenotype was significantly altered. The mitotic spindle was enlarged and the number of microtubule bundles was reduced. The spatial distribution of these bundles was perturbed with more bundles being present around the perimeter of the spindle and fewer in the central part. The number of microtubule bundles in cells expressing augmin was doubled from prometaphase to metaphase, while the number of microtubule bundles in knockdown treatment remained almost the same. All these results show that augmin plays a critical role in amplification of microtubules in early mitosis and that those microtubules assist in the maintenance of spindle architecture and function.

Key words: augmin, metaphase, microtubules, mitotic spindle, prometaphase

## § 7. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Martina Manenica

Datum rođenja: 2. kolovoza 1996.

Mjesto rođenja: Metković

### 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

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

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

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

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