Model diobenog vretena određen momentima sila i silama

Boban, Zvonimir

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:892991

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Zvonimir Boban

MODEL DIOBENOG VRETENA ODREĐEN MOMENTIMA SILA I SILAMA

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
FIZIKA; SMJER ISTRAŽIVAČKI

Zvonimir Boban

Diplomski rad

Model diobenog vretena određen momentima sila i silama

Voditelj diplomskog rada: izv. prof. dr. sc. Nenad Pavin

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____

2. _____

3. _____

Datum polaganja: _____

Zagreb, 2017.

Zahvaljujem se mentoru Nenadu Pavinu i Maji Novak s Fizičkog odsjeka te članovima Tolić grupe s IRB-a na savjetima i novom znanju koje sam stekao tokom pisanja ovog diplomskog rada.

Sažetak

Diobeno vreteno je stanična struktura koja se formira za vrijeme stanične diobe kako bi se genetski materijal jednoliko podijelio među stanicama kćeri. Sile igraju ključnu ulogu u funkcioniranju vretena, sudjelujući u pomicanju njegovih dijelova i održavanju oblika. Unatoč tome, te sile nije lako odrediti korištenjem dosadašnjih eksperimentalnih metoda pa se stoga o njima jako malo zna. Kako bismo riješili ovaj problem, proučavamo oblik vretena i izvlačimo zaključke o silama na temelju poznavanja elastičnih svojstava mikrotubula. Promatranjem diobenih vretena ljudskih stanica STED superrezolucijskom mikroskopijom, vidjeli smo da svežnjevi mikrotubula nalikuju oblicima slova C i S. Uz pomoć konfokalne mikroskopije, snimana su vretena orijentirana približno okomito na ravninu snimanja te je otkriveno da posjeduju kiralnost. Pokazano je da je kiralnost lijeva sa srednjim helicitetom svežnjeva od oko -1 stupanj/μm. Kako bi se perturbirao iznos heliciteta, mijenjana je aktivnost motornog proteina kinezina 5. Razvijen je i teorijski model u kojemu je svežanj mikrotubula opisan kao tanki elastični štap. Kako bi se objasnila eksperimentalna opažanja, model predviđa postojanje momenata sila uz same sile. Zaključujemo kako uz sile, oblik diobenog vretena određuju i momenti sila generirani od strane motornih proteina.

Ključne riječi: Diobeno vreteno, svežnjevi mikrotubula, kiralnost, helicitet, sile, momenti sila, motorni proteini, kinezin 5, savijanje, uvijanje, STED, konfokalna mikroskopija, vertikalna vretena, praćenje, FCPT, STLC

Mitotic spindle model determined by torques and forces

Abstract

The mitotic spindle is a micromachine formed during cell division to ensure even distribution of genetic material amongst daughter cells. Forces in the spindle play a key role in its functioning, by driving movement of its constituents and maintaining its shape. However, these forces are not easily accessible by current experimental techniques and, therefore, remain to a large extent unknown. To tackle this problem, we study spindle shape and infer forces from elastic properties of microtubules. We used STED super-resolution microscopy to image human cell spindles and found that microtubule bundles resemble C and S letter shapes. By using confocal imaging of spindles oriented roughly perpendicular to the imaging plane, we show that they possess chirality. We found that chirality is left-handed with an average bundle helicity around -1 deg/μm. To perturb the twisting moment in our spindles, we altered the activity of motor protein kinesin-5 (Eg5/Kif11). A theoretical model is developed with a microtubule bundle described as an elastic slender rod, which suggests that a torque is required to generate the observed helical shapes. We conclude that torques generated by motor proteins, in addition to forces, exist in the spindle and determine its shape.

Keywords: Mitotic spindle, microtubule bundles, chirality, helicity, forces, torques, motor proteins, kinesin 5, bending, twisting, STED, confocal microscopy, vertical spindles, tracking, FCPT, STLC

Sadržaj

1 Uvod **1**

1.1 Organizacija diobenog vretena 1

1.2 Fluorescentna mikroskopija 5

1.2.1 Epifluorescentna mikroskopija 5

1.2.2 Konfokalna fluorescentna mikroskopija 7

1.2.3 STED superrezolucijska mikroskopija 8

2 Prostorna organizacija svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu **10**

2.1 Oblici svežnjeva mikrotubula u metafaznom vretenu 10

2.2 Konfokalna mikroskopija vertikalnih diobenih vretena 12

2.3 Rotacija referentne osi i izračun kutnih pomaka 14

2.4 Rezultati analize 17

3 Perturbacija heliciteta u diobenom vretenu mijenjanjem aktivnosti motornog proteina kinezina 5 **21**

3.1 Tretiranje stanica STLC-em 21

3.2 Tretiranje stanica FCPT-om 25

3.3 Overekspresija kinezina 5 28

3.4 Kontrola 29

4 Teorijski model **31**

5 Zaključak **34**

Dodaci **36**

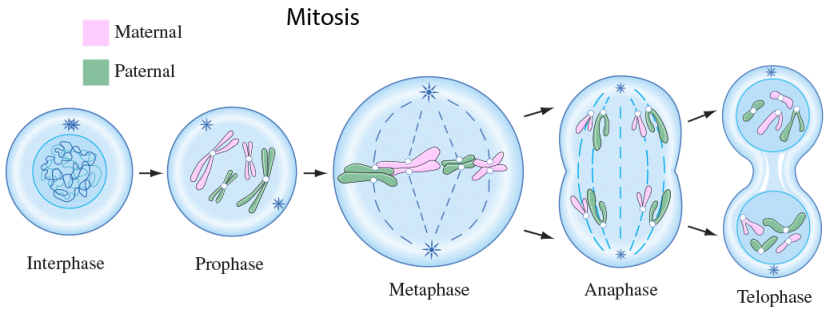
A Diskusija greške metode **36**

Literatura **38**

1 Uvod

1.1 Organizacija diobenog vretena

U nastojanju za razumijevanjem mehanizama i struktura koji su ključni za nastanak i održavanje ljudskog života, prije ili kasnije doći ćemo do diobenog vretena. Diobeno vreteno je stanična struktura koja se formira za vrijeme stanične diobe - procesa pri kojem se stanica dijeli iz roditeljske u stanice kćeri (Slika 1.1). Uloga diobenog



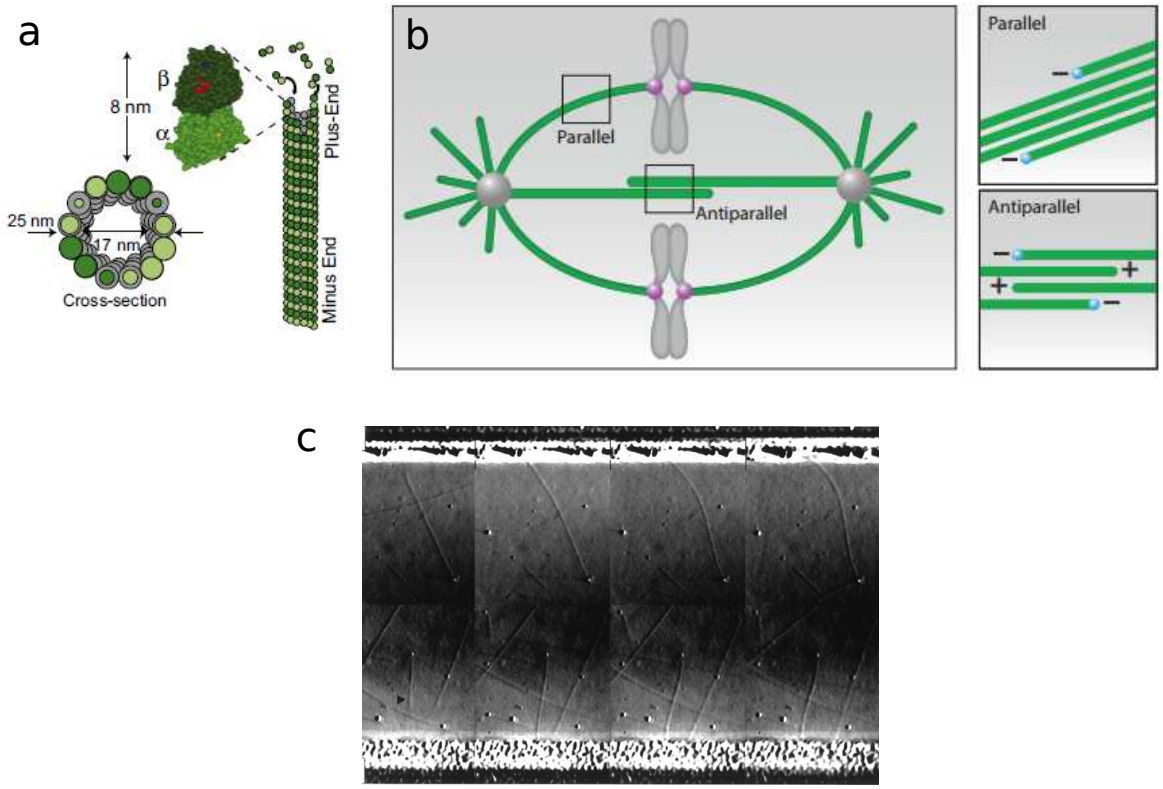
Slika 1.1: Shematski prikaz faza stanične diobe. Zelenom i ružičastom bojom prikazani su kromosomi a isprekidanim plavim crtama svežnjevi mikrotubula.

vretena jednolika je raspodjela genetskog materijala između stanica kćeri. Stanična dioba sastoji se od više faza. Ovdje je proučavano diobeno vreteno u metafazi koju karakterizira poravnanje genetskog materijala u jednu ravninu u sredini vretena (metafazna ravnina).

Strukturu diobenog vretena tvore mikrotubuli - šuplje cjevčice unutarnjeg promjera 17 nm i vanjskog promjera 22 nm koje se sastoje od α i β tubulinskih podjedinica. Ovisno o tipu podjedinice, razlikujemo plus i minus kraj mikrotubula. Plus kraj je dinamičniji (brži rast i skraćivanje) i karakteriziran je β podjedinicama (Slika 1.2a). Ako mikrotubuli rastu iz suprotnih polova i povezuju se, tvore antiparalelne svežnjeve. Ako pak interagiraju svežnjevi koji izlaze iz istog pola, nastale strukture nazivaju se paralelnim svežnjevima (Slika 1.2b). Kinetohorni svežnjevi (k-svežnjevi) svežnjevi su paralelnih mikrotubula koji se vežu na kinetohoru - proteinski kompleks na kromosomu.

Važno je naglasiti kako su mikrotubuli na koje ne djeluju nikakve sile ravni pri sobnoj temperaturi [3] s duljinom ustrajnosti[1] od otprilike 1 mm (Slika 1.2c).

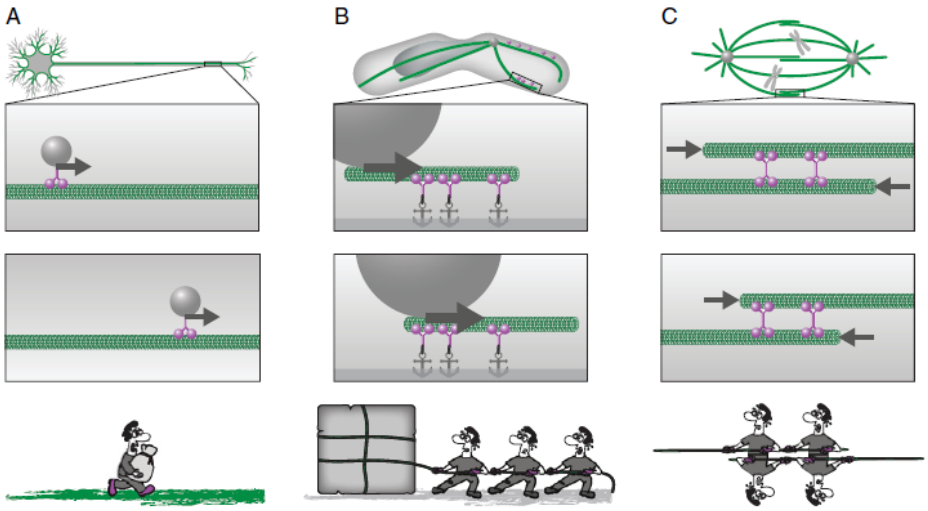
[1] Duljina ustrajnosti je duljina pri kojoj se objekt učvršćen na jednom kraju počinje značajno savijati.



Slika 1.2: Svojstva mikrotubula i pozicioniranje unutar diobenog vretena. a) Oblik i dimenzije mikrotubula. Preuzeto iz [2]. b) Shema metafaznog diobenog vretena. Zelenom bojom označeni su svežnjevi mikrotubula koji rastu iz polova vretena označenih sivim kuglama. Kromosomi su izduljene sive tvorbe u sredini i zakačeni su na kinetohore-proteinske komplekse označene ljubičastim kuglicama. Sa strane su slike uvećanih komadića paralelnih i antiparalelnih svežnjeva na kojima su plavim kuglicama označena mjesta nukleacije. Preuzeto iz [1]. c) Odgovor mikrotubula na vanjsku silu. Mikrotubul raste ravno dok ne naiđe na vanjsku prepreku te se počinje savijati. Preuzeto iz [3].

Ta duljina puno je veća od dimenzija diobenog vretena (otprilike 10 μm) pa budući vidimo da mikrotubuli nisu ravni u diobenom vretenu, na njih moraju djelovati sile.

Uz određivanje oblika diobenog vretena, mikrotubuli služe i kao tračnice za motorne proteine - molekularne motore koji se mogu pomicati po površinama uz potrošnju energije te tako obavljati zadatke poput prenošenja tereta unutar stanice [4]. Motorni proteini koji se pomiču po mikrotubulima su kinezini i dineini. Interakcija motornih proteina s mikrotubulima jedan je od načina generiranja sila na mikrotubule. Motorni proteini mogu interagirati s mikrotubulima na više načina. U prvom slučaju, motori koriste mikrotubule kao tračnice za prijenos tereta (Slika 1.3a). U drugom slučaju motori su usidreni i koriste mikrotubule kao užad za povlačenje velikog tereta (npr. stanične jezgre) (Slika 1.3b). U posljednjem scenariju, motori stvaraju sile koje uzrokuju smicanje mikrotubula (Slika 1.3c).

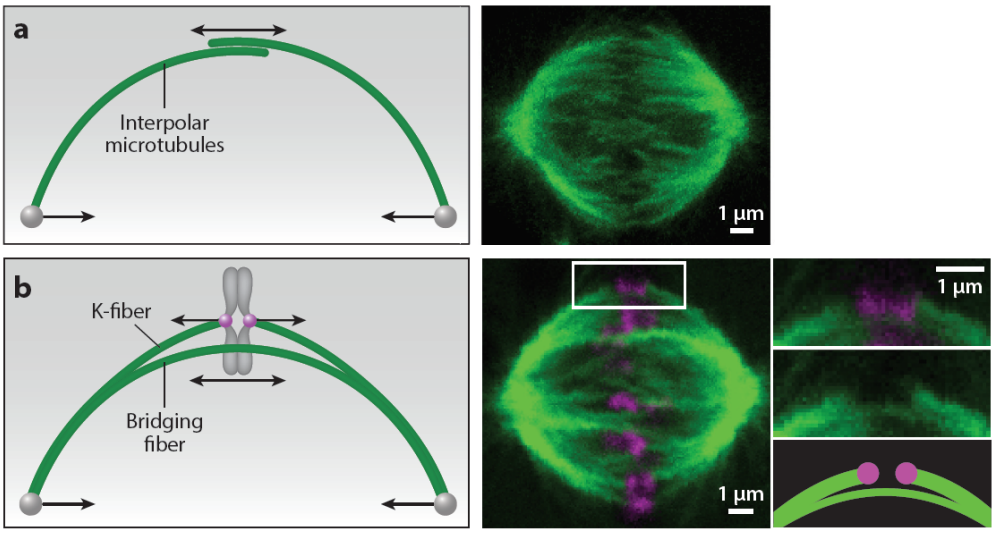


Slika 1.3: Scenariji interakcija motornih proteina s mikrotubulima. Gornji red pokazuje shemu bioloških struktura u kojima je određena vrsta interakcije najizraženija. Dva srednja reda prikazuju dvije točke u vremenu pri odvijanju određene vrste interakcije. Posljednji red shematski ilustrira odgovarajuće interakcije. Mikrotubuli su označeni zelenom, teret sivom, a motori ljubičastom bojom. U scenariju b) nacrtana su i sidra povezana s motorima kako bi se prikazalo da u tom slučaju motori ne miču. Preuzeto iz [5].

Ljudsko metafazno diobeno vreteno ima sličan oblik bez obzira na vrstu stanica što ukazuje na neovisnost mehanizma rada o staničnoj vrsti. Oblik vretena određen je raspodjelom mikrotubula, a raspodjela mikrotubula povezana je sa silama koje djeluju unutar vretena. Stoga, shvaćanjem mehaničkih čimbenika koji uvjetuju oblik mikrotubula, otkrivamo kako funkcionira diobeno vreteno.

Teorijski modeli koji opisuju oblik vretena pravljeni su i ranije. Tako npr. Rubinstein et al. [6] uvode model u kojem uzimanjem u obzir sila na polovima, smicanje mikrotubula u području njihova preklopa te elastičnost mikrotubula predviđaju zakrivljeni oblik svežnjeva mikrotubula kakav viđamo u udžbenicima (Slika 1.4a).

Promatranjem oblika diobenog vretena, primijećeno je kako su i kinetohorni svežnjevi također zakrivljeni što bi ukazivalo na postojanje kompresivne sile. Unatoč tome, laserskom ablacijom (rezanjem mikrotubula korištenjem lasera) pokazano je postojanje tenzije na kinetohorama. Naime, nakon laserskog rezanja svežnja u neposrednoj blizini jedne od kinetohora, uočeno je približavanje sestrinskih kinetohora [7], [8], [9]. Rješenje ovog paradoksa jest postojanje još nekog elementa koji bi uravnotežio tenziju na kinetohorama - mostnog svežnja (Slika 1.4b). Ovo rješenje potvrđeno je ablacijskim eksperimentima i novim teorijskim modelom koji uz sile na polovima te elastičnost mikrotubula uzima u obzir i silu koja djeluje na kinetohori [9].



Slika 1.4: Sile koje oblikuju diobeno vreteno. a) Lijevo: Sile (crne strelice) na polovima (sive kugle) i smicanje mikrotubula u području preklopa uzrokuju ispupčeni oblik mikrotubula. Desno: HeLa stanica obilježena tubulinom. b) Shema svežnja koji je pod tenzijom kod kinetohora (ljubičaste kugle) i pod kompresijom na polovima (sive kugle). Ove sile uravnotežene su kompresijom u mostnom svežnju. Ukupan rezultat je opet ispupčeni oblik. Desno: HeLa stanica s obilježenim tubulinom (zeleno) i kinetohorama (ljubičasto) te uvećanim dijelom oko kinetohora (područje označeno bijelim pravokutnikom). Preuzeto iz [1].

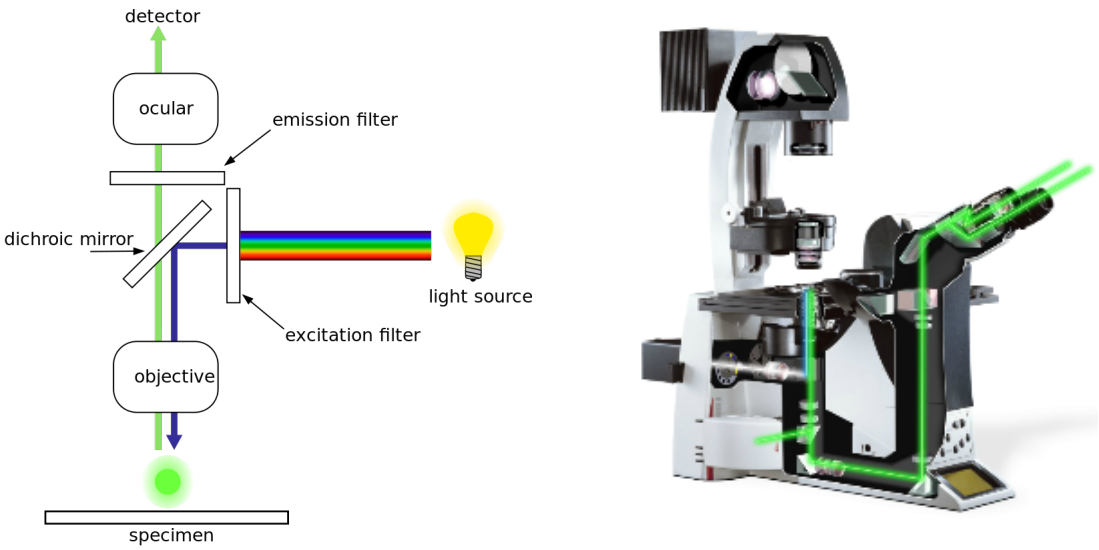
Zajedničko svim dosadašnjim razmatranjima je modeliranje potpuno ravninskih ispupčenih oblika. U ovom radu prikazat ćemo rezultate analize eksperimenata koji pokazuju postojanje heliciteta svežnjeva mikrotubula uzrokovanog djelovanjem motornih proteina u diobenom vretenu. Također, bit će predstavljen teorijski model koji uzimanjem u obzir elastičnih svojstava mikrotubula demonstrira kako je za nastajanje oblika svežnjeva viđenih u eksperimentu uz sile nužno i postojanje momenata sila na polovima, što je novina u odnosu na dosadašnja razmatranja.

1.2 Fluorescentna mikroskopija

Da bismo mogli nešto govoriti o oblicima vretena, potrebna nam je odgovarajuća eksperimentalna aparatura. U ovom slučaju, to su standardna konfokalna fluorescentna mikroskopija i STED superrezolucijska mikroskopija.

1.2.1 Epifluorescentna mikroskopija

Kao uvod u razumijevanje principa rada konfokalne fluorescentne mikroskopije, prvo ćemo se upoznati s principom radom običnog epifluorescentnog mikroskopa.
Fluorescentni mikroskop je svjetlosni mikroskop koji umjesto standardne metode dobivanja slike osvjetljivanjem uzorka vanjskim izvorom svjetlosti koristi fluorescenciju iz samog uzorka kao jedinu svjetlost koja dolazi na okular. Kako bismo razumjeli princip rada fluorescentnog mikroskopa, promotrimo sliku 1.5.



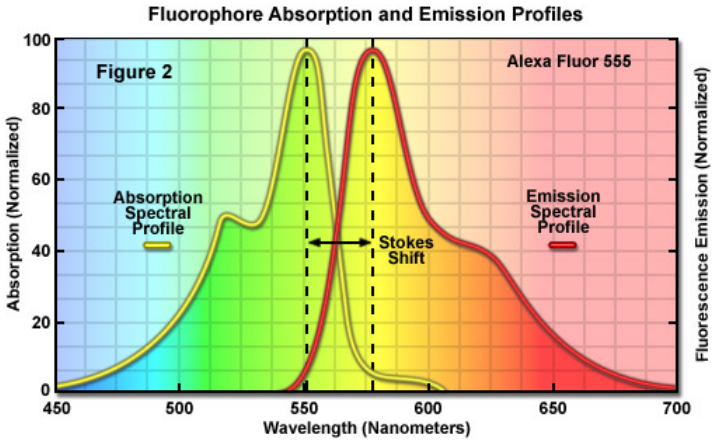
Slika 1.5: Princip rada fluorescentnog mikroskopa. Lijevo: Shema rada fluorescentnog mikroskopa. Desno: Presjek fluorescentnog mikroskopa. Preuzeto iz [10], [11].

Da bismo mogli promatrati fluorescenciju moramo uzorak nekako pobuditi. U tu svrhu koristi se izvor pobuđujuće svjetlosti označen svijetlećom žaruljom. Iz izvora svjetlost dolazi do najbitnijeg dijela, dikroičnog zrcala (”dichroic mirror”). Njegova karakteristika je propuštanje određenih valnih duljina svjetlosti i reflektiranje ostalih. Nakon refleksije na dikroičnom zrcalu, pobuđujuća svjetlost preko objektiva dolazi do uzorka kojeg pobuđuje na fluoresciranje. Fluorescirana svjetlost preko objektiva dolazi opet na dikroično zrcalo, no ono je konstruirano tako da propušta te valne

duljine pa fluorescirana svjetlost dospijeva na okular i dobiva se slika. Ista shema superponirana je na stvarni mikroskop radi zornijeg prikaza (Slika 1.5 desno).

Efekt ključan za rad fluorescentnog mikroskopa je Stokesov pomak - pojava da svjetlost koju uzorak emitira ima veću valnu duljinu (manju energiju) od pobuđujuće svjetlosti. Ovo je važno jer inače ne bismo imali način razlikovanja fluorescirane od pobuđujuće svjetlosti.

Razlog Stokesovog pomaka je što se za trajanja srednjeg ekscitacijskog vremena (reda veličine 10^{-9} s) dio energije potroši na vibracijske relaksacije (relaksacija na najnižu vibracijsku energiju pobuđenog stanja) koje se događaju na kraćoj vremenskoj skali (reda veličine 10^{-12} s) . Dobiveni višak energije pretvara se u toplinu koja se apsorbira u susjedne molekule.



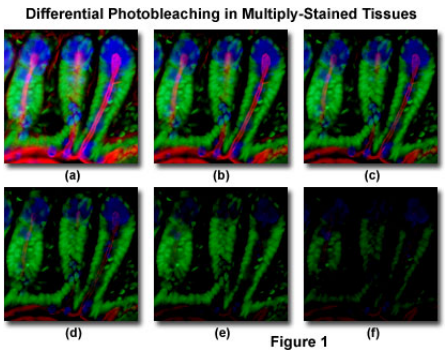
Slika 1.6: Stokesov pomak. Preuzeto iz [12]

Očito, ovisno o apsorpcijskom maksimumu tvari koju želimo promatrati, koristit ćemo izvor pobuđujuće svjetlosti odgovarajuće frekvencije, tj. izvor s emisijskim maksimumom na istoj frekvenciji.

Još jedna važna pojava vezana uz fluorescentnu mikroskopiju naziva se fotoizbjeljivanje (”photobleaching”). Fotoizbjeljivanje podrazumijeva fotokemijsku promjenu koja uništava sposobnost fluoresciranja uzorka. Ova pojava jedna je od najvećih zapreka pri korištenju fluorescentne mikroskopije i ovisno o vrsti, može izblijediti uzorak u rasponu od desetine sekunde do nekoliko minuta.

Zanimljivo je istaknuti kako je fotoizbjeljivanje nekad i korisno u procesu priprave uzorka. Naime, uzorak koji promatramo može posjedovati urođenu sposobnost fluoresciranja (autofluorescenciju) koja pri mikroskopiranju može stvarati neželjen sig-

nal. Kako bismo što više umanjili taj doprinos fotoizbjeljujemo uzorak prije unosa fluorofora (tvari koje fluoresciraju) koje stvarno želimo promatrati.

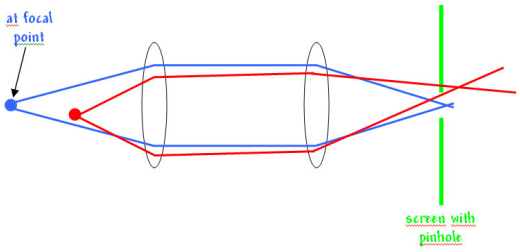


Slika 1.7: Primjer fotoizbjeljivanja. Preuzeto iz [13]

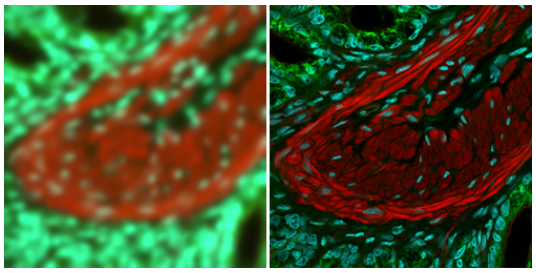
1.2.2 Konfokalna fluorescentna mikroskopija

Konvencionalna mikroskopija koristi za uzorke tanko prerezane presjeke pa stoga ne predstavlja dobru metodu za promatranje debljih uzoraka tkiva ili ”in vivo” promatranja uzoraka.

Konfokalna mikroskopija, koju je 1955. osmislio i patentirao Marvin Minsky, rješava ovaj problem dodavanjem još jednog ključnog dijela mikroskopu - zaslona s rupicom (”pinhole”)



Slika 1.8: Zaslon s rupicom (pinhole). Preuzeto iz [14]

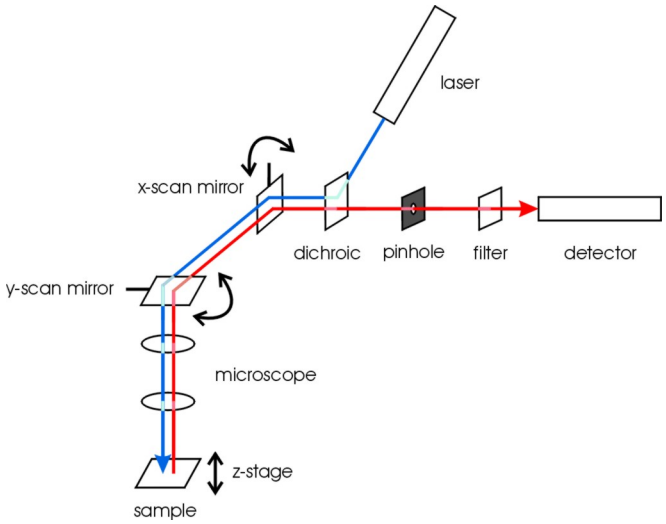


Slika 1.9: Uzorak tkiva debelog crijeva promatran epifluorescentnim (lijevo) i konfokalnim mikroskopom (desno). Preuzeto iz [15]

Ako pogledamo postav na slici 1.8, vidimo da su leće i zaslon postavljeni na način da kroz rupicu prolazi samo svjetlo koje dolazi iz fokusa prve leće (plava linija na slici). Svjetlo koje dolazi iz bilo koje druge točke unutar uzorka (crvena linija) neće doći do detektora. Ovakav način rada omogućava stvaranje virtualnih presjeka bez potrebe za fizičkim rezanjem tkiva.

Također, izbjegavanjem doprinosa točki van fokusa dobivamo oštriju i čišću sliku. Uz poboljšanu kvalitetu slike, konfokalna mikroskopija omogućava nam i stvaranje 3D slika kombiniranjem više virtualnih presjeka. Navedene prednosti konfokalne mikroskopije dovode do velike razlike u kvaliteti slike "običnog" u odnosu na konfokalni mikroskop vidimo (Slika 1.9).

Ograničenja konfokalne mikroskopije su fotoizbjeljivanje te ograničeno prodiranje svjetlosti u uzorak (prodiranje do otrpilike 200 μm u kožu). Jedan od nedostataka je i visoka cijena u usporedbi s konvencionalnim mikroskopima. Na slici 1.10 vidi se princip rada konfokalne laserske pretražne mikroskopije ("confocal laser scanning miscroscopy" = CLSM).



Slika 1.10: Princip rada konfokalne laserske pretražne mikroskopije. Preuzeto iz [16]

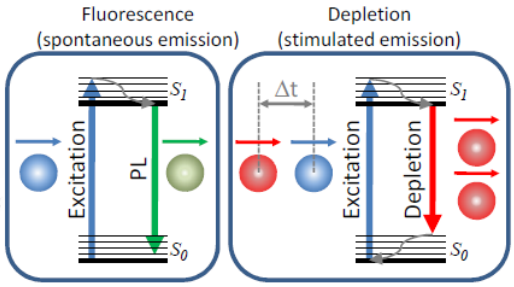
Kao izvor pobuđujuće svjetlosti koristi se laser koji nakon refleksije na dikroičnom zrcalu nailazi na još dva zrcala koja se mogu kontrolirano okretati te tako precizno pobuđivati željeni dio uzorka. Nakon prolaska kroz dikroično zrcalo, zbog korištenja zaslona s rupicom, samo svjetlost emitirana iz dijela uzorka u fokusu leće dolazi do detektora. Svaki od djelića slike uzorka koji dospije u detektor obrađuje računalo te tako stvara ukupnu sliku.

1.2.3 STED superrezolucijska mikroskopija

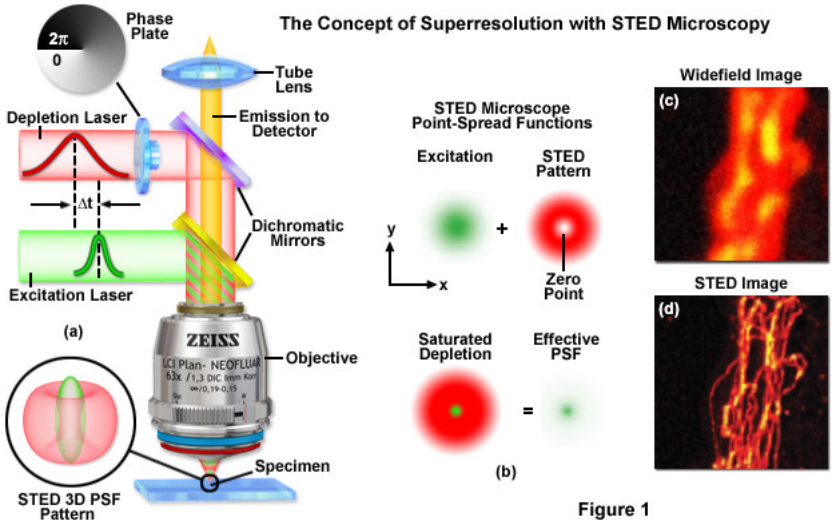
STED ("Stimulated emission depletion") mikroskopija zasniva se na konfokalnoj mikroskopiji uz dodatak drugog lasera koji omogućava smanjenje regije fluoresciranja. Mehanizam počiva na pojavi stimulirane emisije. Slika 1.11 pokazuje dijagrame pri-

jalaza koji se odvijaju u uzorku. Na uzorak prvo dolazi ekscitacijski laser koji ekscitira sistem u pobuđeno stanje (iz S0 u S1). Nakon brzih vibracijskih relaksacija dolazi do fluoresciranja emisijom jednog fotona (lijevi panel u slici 1.11). Dovođenjem drugog (deplecijskog) lasera na uzorak za vrijeme dok je sistem još u pobuđenom stanju uzrokujemo stimuliranu emisiju, tj. sistem apsorbira deplecijski foton i relaksira se emisijom dvaju fotona valnih duljina istih kao i kod ulaznog fotona (desni panel u slici 1.11). Ovdje je bitno primijetiti da pogodnim odabirom frekvencije deplecijskog lasera i filtera (dikroičnog zrcala) možemo iz signala koji dolazi na detektor izbaciti fotone nastale relaksacijom zbog stimulirane emisije. Ako profil intenziteta deplecijskog lasera napravimo u obliku diska s rupom u sredini, možemo suziti regiju fluoresciranja te tako povećati rezoluciju (Slika 1.12).

Nedostatak STED mikroskopije je brzo fotoizbjelijivanje zbog ovisnosti stimulirane emisije o broju ulaznih fotona.



Slika 1.11: Shema fluorescencije i stimulirane emisije. Preuzeto iz [17]



Slika 1.12: Princip rada STED mikroskopije. Preuzeto iz [18]

2 Prostorna organizacija svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu

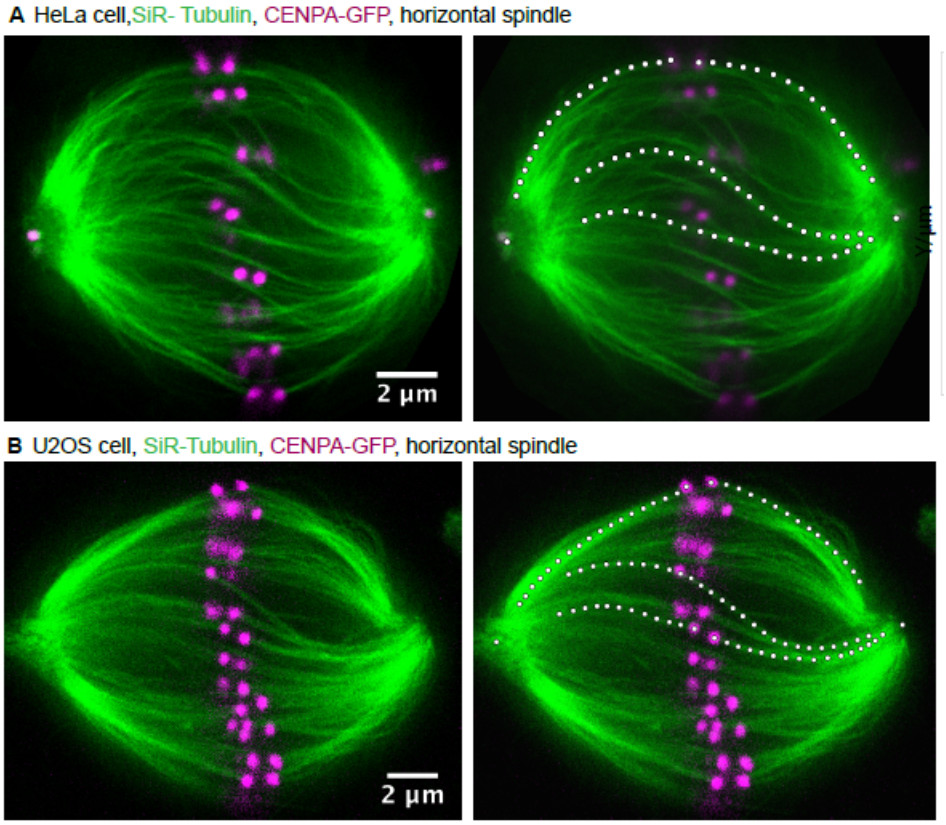
2.1 Oblici svežnjeva mikrotubula u metafaznom vretenu

Kako bismo saznali kakve oblike mogu imati svežnjevi mikrotubula u diobenom vretenu, proučavana su dva tipa uzoraka - HeLa i U2OS stanice obilježene PRC1 proteinom i tubulinom[2]. HeLa stanice su stanice raka grlića maternice, a U2OS stanice koštanog raka. Ranije spomenuti tubulin gradivna je jedinica mikrotubula, dok se PRC1 protein nakuplja u području u kojem postoje antiparalelni svežnjevi. Dva su bitna razloga korištenja stanica raka. Prvi je razlog što se stanice raka brže dijele, a drugi što se mogu dijeliti beskonačno puta. Naime, normalne ljudske stanice mogu se podijeliti ograničen broj puta zbog skraćivanja kromosoma tijekom svake diobe. Stanice raka pak posjeduju protein koji nakon svake diobe obnavlja skraćeni dio omogućujući tako beskonačnu diobu.

Promatranje diobenog vretena standardnom kofokalnom mikroskopijom zbog rezolucijskog ograničenja ne pruža dovoljno preciznu informaciju o prostornoj organizaciji svežnjeva mikrotubula. Ovo ograničenje se pogotovo ističe u blizini polova zbog gustoće signala mikrotubula u tom području. Zbog toga je korištena STED superrezolucijska mikroskopija koja rezoluciju dovodi do otprilike 50 nm. Snimanjem STED presjeka HeLa i U2OS vretena omogućena je detaljnija vizualizacija i praćenje oblika svežnjeva od pola do pola (Slika 2.1).

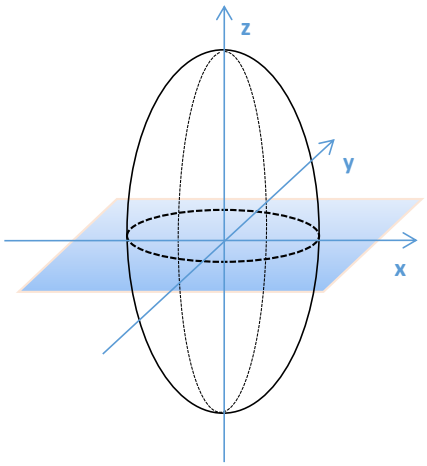
Tipičan oblik vanjskih svežnjeva podsjeća na oblik slova C, dok približavanjem dugoj osi vretena nailazimo i na svežnjeve oblika nalik slovu S. Stoga, nazivamo ove svežnjeve C i S svežnjevima. Iako ove dvije vrste svežnjeva izgledaju različito u horizontalnom vretenu, one mogu nastati i kao projekcije 3D oblika pa se otvara pitanje dijele li ti oblici zajedničku prostornu organizaciju.

[2]Svu mikroskopiju obavili su Bruno Polak i Juraj Simunić iz Tolić grupe sa Instituta Ruđer Bošković.



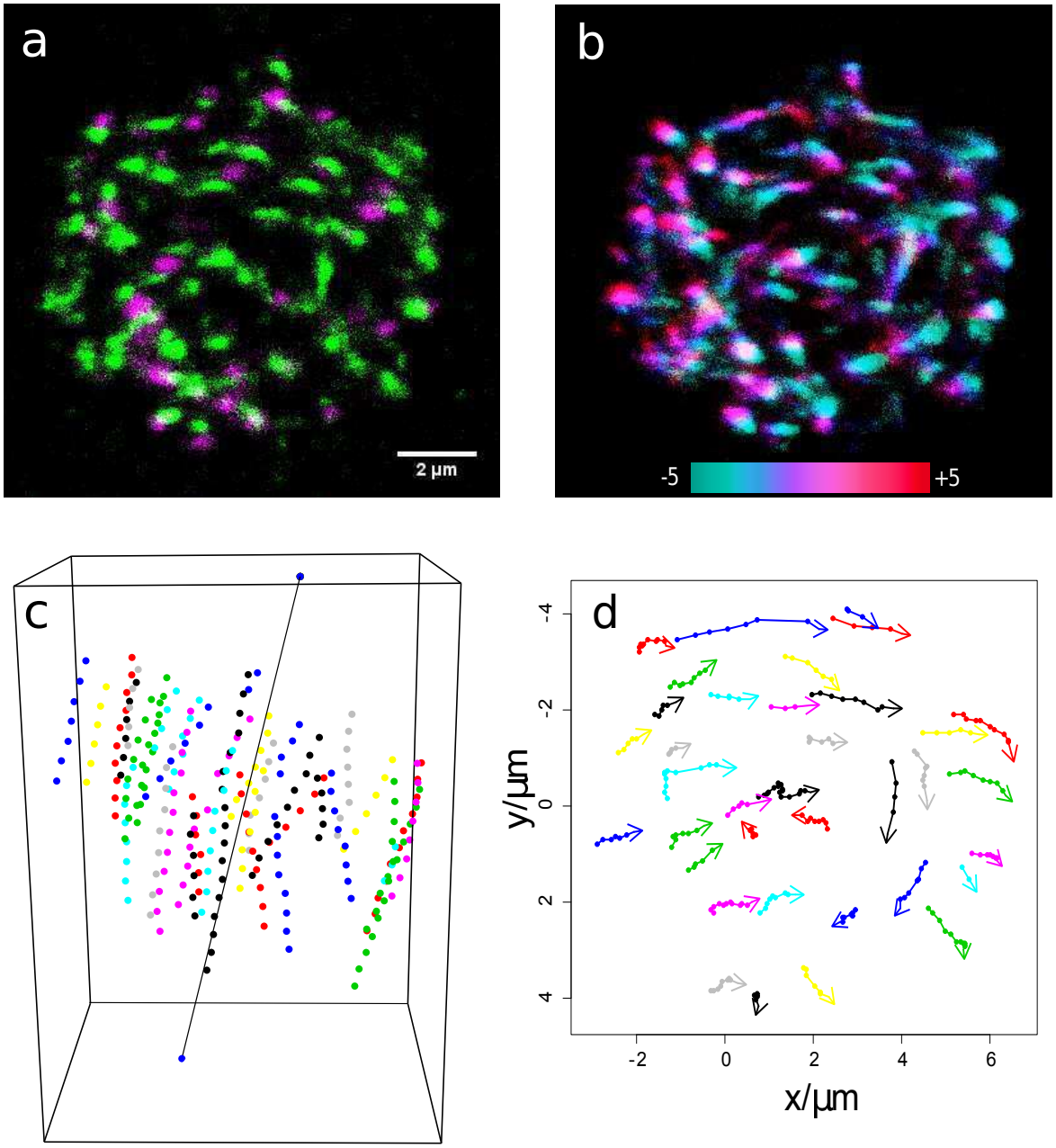
Slika 2.1: STED slike horizontalnih HeLa i U2OS vretena. Mikrotubuli su označeni zelenom, a kinetohore ljubičastom bojom. Bijelim točkama su ispraćeni uočeni karakteristični oblici svežnjeva mikrotubula.

2.2 *Konfokalna mikroskopija vertikalnih diobenih vretena*



Slika 2.2: Shema orijentacije vretena obzirom na ravninu snimanja. Ono što vidimo konfokalnom mikroskopijom određeno je presjekom ravnine snimanja (plava ravnina) s diobenim vretenom (elipsoid).

Iz STED slika horizontalnih vretena dobili smo dobru informaciju o pružanju svežnjeva u jednoj ravnini (xy ravnina mikroskopa). Unatoč tome, izostaje jednako precizna informacija o trećoj koordinati zbog rezolucijskog limita od otprilike 800 nm u z smjeru. Ovaj problem rješavamo korištenjem standardne konfokalne mikroskopije, ali ovaj put promatrajući vretena položena tako da je duga os okomita na ravninu snimanja mikroskopa (vertikalna vretena) (Slika 2.2). Pronalaskom metafaznih vretena ovakve orijentacije i njihovim snimanjem duž duge osi dobivamo niz presjeka u kojima se pojedini svežnjevi mikrotubula vide kao točke (2.3a). Metafaza je identificirana pomoću karakterističnog položaja kinetohora u toj fazi (2.3a). Promatranjem projekcije presjeka oko procijenjenog položaja metafazne ravnine uz pridavanje drugačije boje svakoj ravnini ovisno o visini, može se uočiti rotacija svežnjeva (2.3b). Korištenjem Fiji softvera za praćenje svežnjeva te R programskog jezika za analizu, možemo rekonstruirati 3D oblik (2.3c) i tlocrt (2.3d). Iz tlocrta se kao i kod bojane projekcije opet može uočiti postojanje rotacije.



Slika 2.3: Vizualizacija svežnjeva mikrotubula u vretenu pomoću konfokalne mikroskopije. a) Presjek vertikalnog vretena žive HeLa stanice označene PRC1 proteinom. PRC1 signal označen je zelenom bojom. Signal kinetohora označen je ljubičastom bojom. b) Projekcija 5 presjeka iznad i ispod procijenjenog položaja metafazne ravnine. Nisu uključeni svi presjeci jer je signal kod PRC1 obilježenih vretena najjači u području u kojem su antiparalelni svežnjevi, tj. oko metafazne ravnine. Svaka ravnina označena je drugačijom bojom ovisno o udaljenosti tog presjeka od podloge. U podnožju slike je legenda boje u ovisnosti o visini presjeka. Boje idu od plave do crvene kako raste z koordinata (kako se udaljavamo od podloge). c) 3D prikaz ispraćenih svežnjeva mikrotubula d) Tlocrt ispraćenih svežnjeva. Ishodište je na položaju jednog od polova. Hvatište strelice je u poljednjoj ispraćenoj točki svežnja. Smjer strelice dobiven je usrednjavanjem smjerova između zadnje 4 ispraćene točke svežnja.

2.3 Rotacija referentne osi i izračun kutnih pomaka

Nakon što smo ispratili svežnjeve vretena, želimo kvantificirati rotaciju sustava. Kao prirodan odabir referentne osi za izračun kutnih pomaka nameće se os koja prolazi kroz oba pola vretena.

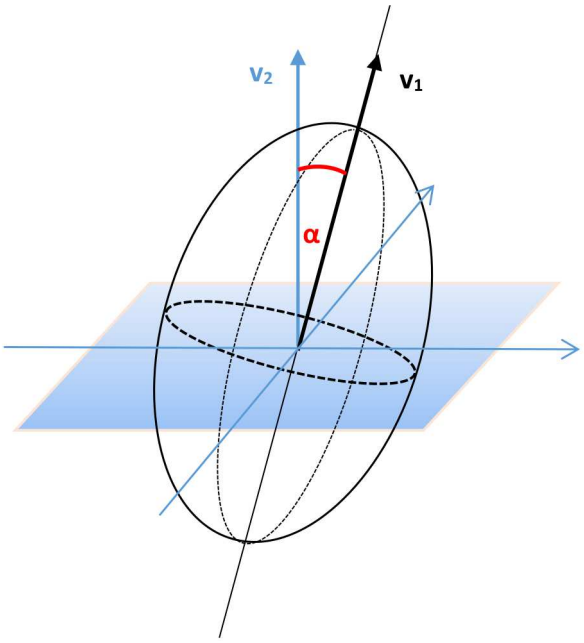
Kao što se vidi na slici 2.3c, u eksperimentu nemamo idealno vertikalna vretena, već su ona uvijek blago nagnuta. Konkretno, vretena su bila nagnuta u intervalu [2.4,25] stupnjeva (12.9 stupnjeva sredina) kod HeLa i [1.6,30] stupnjeva (8.6 stupnjeva sredina) kod U2OS stanica. Kako bismo ispravno izvršili izračun kutnih pomaka, potrebno je uspraviti vreteno. Budući znamo početnu (iz mikroskopije) i konačnu (želimo vertikalno vreteno) orijentaciju duge osi vretena, možemo iskoristiti Rodriguesovu rotacijsku formulu kao elegantan način izračuna matrice rotacije

$$\mathrm{R} = \mathrm{I} + \mathrm{N} \cdot \sin\alpha + \mathrm{N}^2 \cdot (1 - \cos\alpha).$$

U navedenoj jednadžbi, I je 3x3 jedinična matrica, α je kut između novog i starog smjera referentne osi, a N je matrica vektorskog produkta vektora $\mathbf{n}$ ($\mathbf{n} = \mathbf{v_1} \times \mathbf{v_2}, \mathbf{v_1}$ je smjer referentne osi prije, a $\mathbf{v_2}$ smjer referentne osi nakon rotacije). Napisano jednadžbama,

$$\alpha = \arccos\Big(\frac{\mathbf{v_1} \cdot \mathbf{v_2}}{|\mathbf{v1}| \cdot |\mathbf{v2}|}\Big),\ \mathrm{N} = \begin{bmatrix} 0 & -n_3 & n_2 \\ n_3 & 0 & -n_1 \\ -n_2 & n_1 & 0 \end{bmatrix},$$

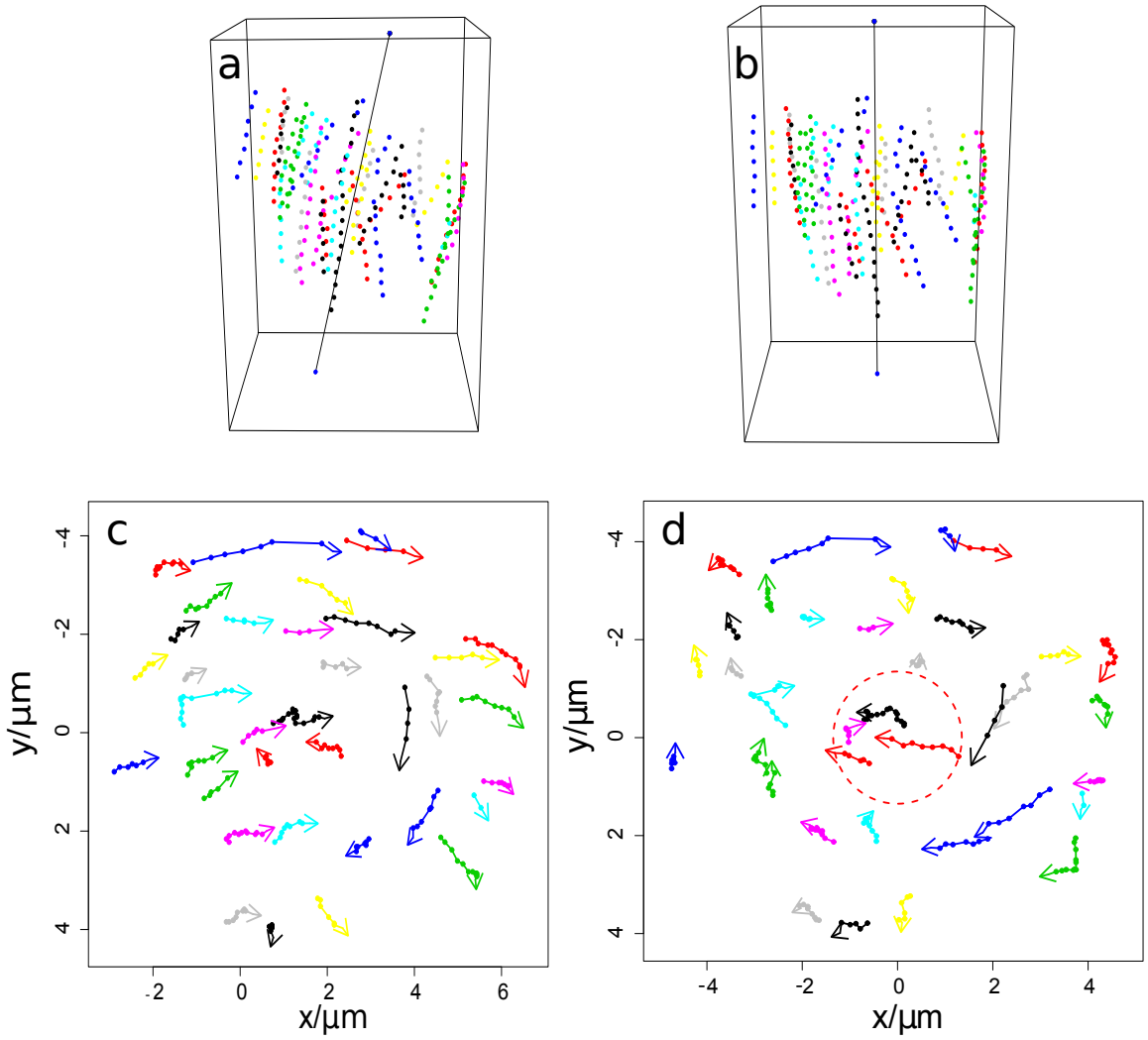
gdje su $n_{1,2,3}$ komponente vektora $\mathbf{n}$. Jednom kad imamo matricu rotacije, rotiramo $\mathbf{v_1}$ oko osi $\mathbf{n}$ za kut α i dobivamo $\mathbf{v_2} = \mathrm{R}\mathbf{v_1}$ (Slika 2.4). Analogno rotiramo sve druge ispraćene točke.



Slika 2.4: Shema parametara iz Rodriguesove formule. Plava ravnina označava ravninu snimanja mikroskopa.

Sada računajući kuteve ispraćenih točki $\phi = \arctan\left(\frac{y-y_{\text{axis}}}{x-x_{\text{axis}}}\right)$ (x i y su koordinate ispraćenih točki; x_{axis} i y_{axis} su odgovarajuće koordinate referentne osi) dobivamo promjenu kuta za svaki ispraćeni pomak svežnja[3]. Ovdje treba biti pažljiv jer je $\arctan$ definiran na domeni $[-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}]$, a nama trebaju kutevi u intervalu $[0, 2\pi]$. Zbog toga ovisno o kvadrantu dodajemo odgovarajuću korekciju. Čak i uz ovu opasku, još uvijek treba pripaziti na granicu između 0 i 2π jer sada tamo imamo diskontinuitet.
Slika 2.5 pokazuje isto vreteno prije i nakon ispravljanja osi. Novi tlocrt još zornije pokazuje zakretanje svežnjeva u vretenu (2.5d). Na istom tlocrtu primjećujemo i dodanu crvenu kružnicu. Ako je prosječna udaljenost svežnja od referentne osi manja od radijusa te kružnice, taj svežanj izbacujemo iz analize. Razlog za ovo je nepreciznost pri procjeni polova iz slika konfokalnog mikroskopa. Naime, isti svežanj će rotirati u drugom smjeru ovisno je li os iznad ili ispod njega u tlocrtu. Također, budući svežnjevi ustvari ne rotiraju oko centralne osi, već samo imaju usmjereno gibanje (moraju početi i završiti u polovima vretena), postoje svežnjevi koji naglo mijenjaju kvadrante u centralnom području pa ih izbacujemo kako ne bismo imali lažne ogromne rotacije.

[3]Sva analiza napravljena je pomoću R programskog jezika.



Slika 2.5: Usporedba izgleda svežnjeva prije i nakon uspravljanja vretena. a),b) 3D rekonstrukcije ispraćenih svežnjeva prije i nakon uspravljanja vretena. c),d) Tlocrti ispraćenih svežnjeva prije i nakon uspravljanja vretena. Smjer strelica dobiven je usrednjavanjem smjerova između zadnje 4 ispraćene točke svežnja.

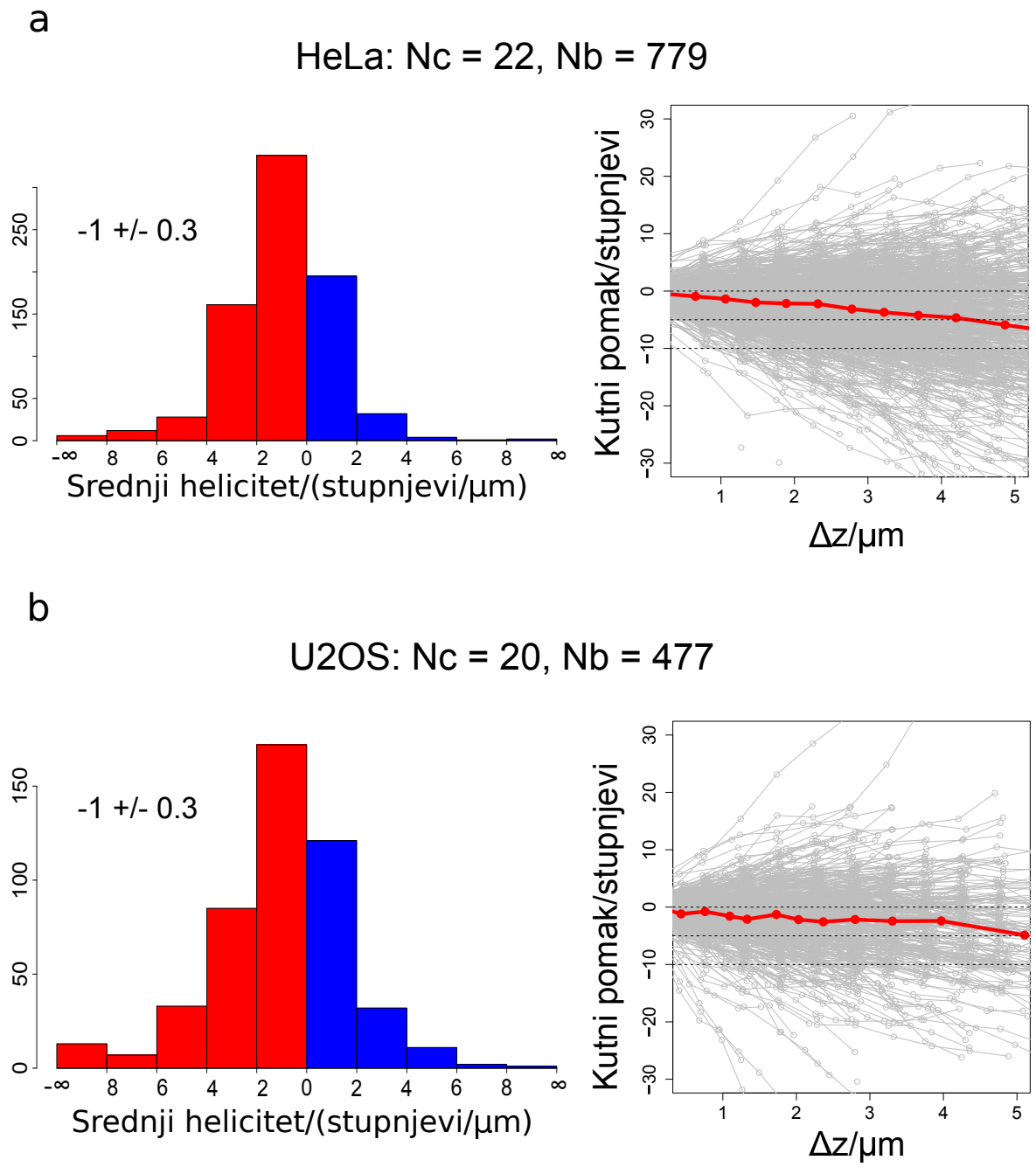
Budući da svežnjevi mijenjaju zakrivljenost obzirom na visinu, nije svejedno koji interval visina ćemo uzimati u obzir u analizi. Kako nas zanima dio svežnja koji možemo aproksimirati kružnim lukom, pri analizi su promatrane točke ispraćene u središnjih 40 posto visine vretena.

Nakon što smo izračunali kutne pomake za ispraćene svežnjeve, imamo sve potrebno za izračun srednjeg heliciteta definiranog kao srednja promjena kuta svežnja s visinom $\left(\frac{\Delta\phi}{\Delta z}\right)_{\text{avg}}$. Naravno, potrebno je i odrediti pogrešku ove metode. Najveći izvor pogreške dolazi od krive procjene položaja polova. Stoga, pri procjeni pogreške, odabrana je stanica s velikim brojem ispraćenih svežnjeva te je procijenjeno područje u kojem bi se nalazili svi mogući položaji polova. Za ovo područje uzeta je kružnica polumjera 0.8 μm centrirana u najboljoj trenutnoj procjeni polova. Položaji polova

su potom mijenjani unutar tih kružnica te je ostvareno 156 različitih kombinacija. Za svaku kombinaciju izračunata je srednja razlika heliciteta u odnosu na početni slučaj. Za grešku zbog procjene polova uzeta je maksimalna srednja razlika u odnosu na početni slučaj koja iznosi 0.31 stupanj/μm. Budući je ova greška nezavisna u odnosu na grešku zbog varijacije populacije, varijance se mogu zbrajati pa dobijemo ukupnu standardnu pogrešku srednje vrijednosti kao korijen zbroja kvadrata pogreške zbog varijacije u populaciji i pogreške zbog moguće loše procjene položaja polova ($SE_{ukupno} = \sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}$).

2.4 Rezultati analize

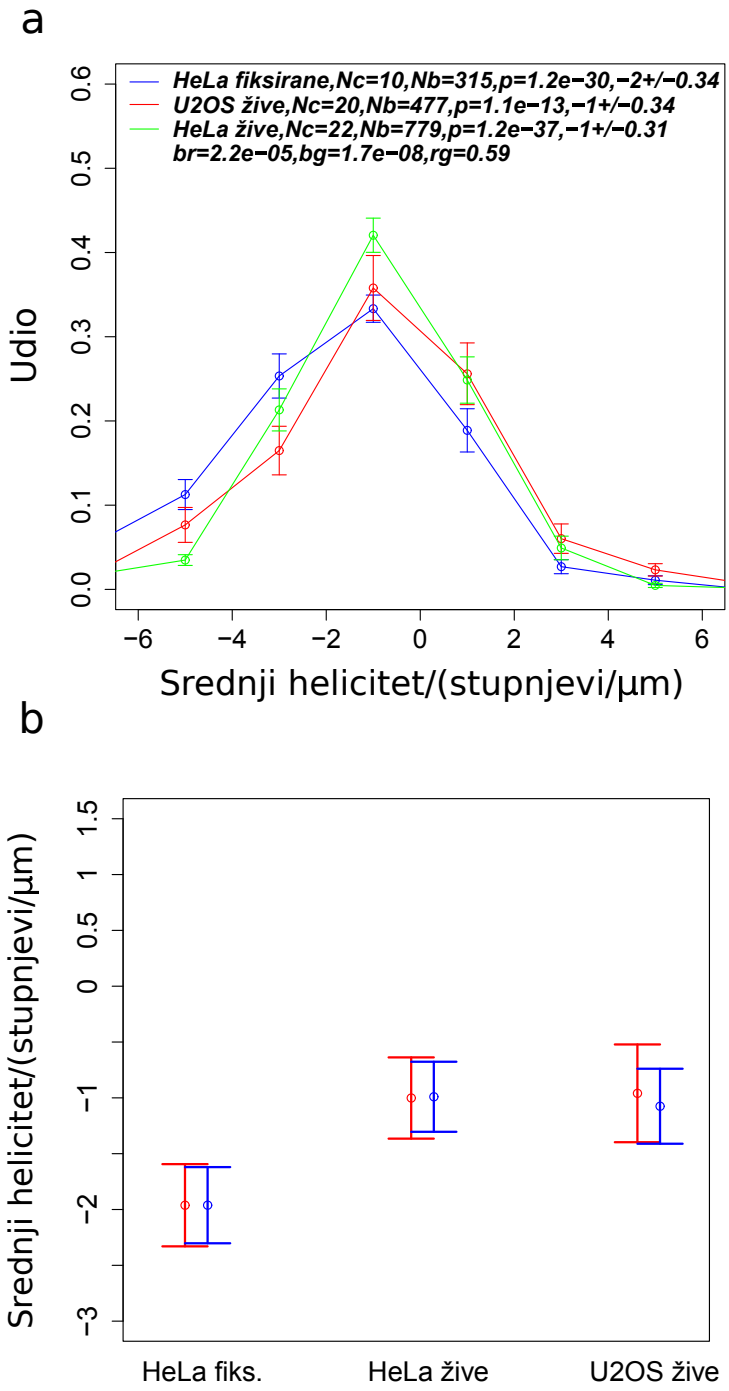
Rezultati su dani u obliku grafa kumulativne promjene kuta (Slika 2.6 a),b) desno.) za svaki svežanj te histograma srednjih heliciteta svežnjeva (Slika 2.6 a),b) lijevo.) Histogrami u oba slučaja pokazuju kako je većina podataka negativna što se odražava i u težinskim srednjim vrijednostima: -1 ± 0.3 deg/μm za HeLa i -1 ± 0.3 deg/μm za U2OS stanice (težinska srednja vrijednost $\pm$ SE_{ukupno}), gdje je težina računata obzirom na duljinu praćenja pojedinog svežnja. Srednja krivulja kumulativne promjene kuta za HeLa stanice pokazuje lijepo slaganje sa izračunatom srednjom vrijednosti, dok je kod ekvivalentnog U2OS grafa ta krivulja nešto izlomljenija (Slika 2.6 a),b) desno.). Unatoč tome srednje vrijednosti heliciteta populacije su jako slične. Razlog je što je kod U2OS stanica obilježen tubulin čiji je signal puno jači u stanicama (mikrotubuli su građeni od tubulina) pa ima i puno više šuma. Posljedično, postoji puno više svežnjeva koji se nisu mogli dugo pratiti pa stoga doprinose srednjoj krivulji samo na njenom početku. Teže praćenje svežnjeva u tubulinom označenom vretenu očituje se i u broju ispraćenih svežnjeva. Tako za HeLa populaciju imamo oko 300 svežnjeva više za samo 2 stanice razlike u odnosu na U2OS populaciju.



Slika 2.6: Rezultati analize. a) HeLa, b) U2OS; Lijevo: Histogrami srednjih heliciteta u stupnjevima po μm za sve ispraćene svežnje. Negativne vrijednosti heliciteta obojene su crveno, a pozitivne plavo. Desno: Kumulativni kutni pomaci obzirom na prijeđeni put za sve ispraćene svežnjeve HeLa i U2OS stanica. Debela crvena linija je krivulja dobivena usrednjavanjem vrijednosti apscise i ordinate za određeni broj susjednih točaka u grafu. Broj točki za usrednjavanje određen je uvjetom da ukupan broj usrednjenih točki bude 12. Uz taj uvjet, kod HeLa usrednjavamo 643, a kod U2OS vretena 336 ispraćenih točki. Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva.

Kako bismo uzeli u obzir da ne možemo u svakoj stanici ispratiti jednak broj svežnjeva, napravljen je histogramski prikaz u kojem su srednje vrijednosti stupaca računate na način da je prvo izračunata srednja vrijednost heliciteta svake stanice pa potom

promatran udio svežnjeva po stupcima za svaku od tih stanica (Slika 2.7a). U histogramu vidimo i jednu dodatnu krivulju koja se odnosi na grupu HeLa uzoraka koji su fiksirani u metafazi (stanice nisu žive, već su prisilno zadržane u metafazi). Za sve prikazane skupine napravljeni su t-testovi s ciljem provjere različitosti srednje vrijednosti od nule i usporedbe svih grupa međusobno. Ekstremno male p vrijednosti t-testova za usporedbu srednjih vrijednosti s nulom nam govore da je efekt statistički značajan. Testovi kojima uspoređujemo grupe kažu nam kako je srednji helicitet fiksiranih HeLa stanica značajno različit od ostalih grupa, dok isto ne možemo reći za dvije grupe sa živim stanicama. Stoga, iako vidimo da efekt u fiksiranim stanicama i dalje postoji te je istog predznaka, vrlo je vjerojatno da ga proces fiksacije pojačava. Kako nam se ne bi dogodilo da zbog par stanica s puno ispraćenih svežnjeva u načinu usrednjavanja po svim svežnjevima dobijemo iskrivljeni rezultat, prikazani su i rezultati dobiveni usrednjavanjem srednjih heliciteta zasebnih stanica (Slika 2.7b crveno). U prve dvije skupine skupine vidimo da oba pristupa daju praktički jednake srednje vrijednosti i standardne pogreške, čime dokazujemo kako rezultat nije artefakt prevage par izrazito kiralnih stanica s puno ispraćenih svežnjeva. Kod živih U2OS stanica, vidimo povećanu standardnu pogrešku u odnosu na prvi način izračuna što ukazuje da stanice te skupine nisu većinski imale sličnu raspodjelu heliciteta svežnjeva već je ukupan rezultat posljedica usrednjavanja većeg broja stanica s popriličnim razlikama u srednjem helicitetu.



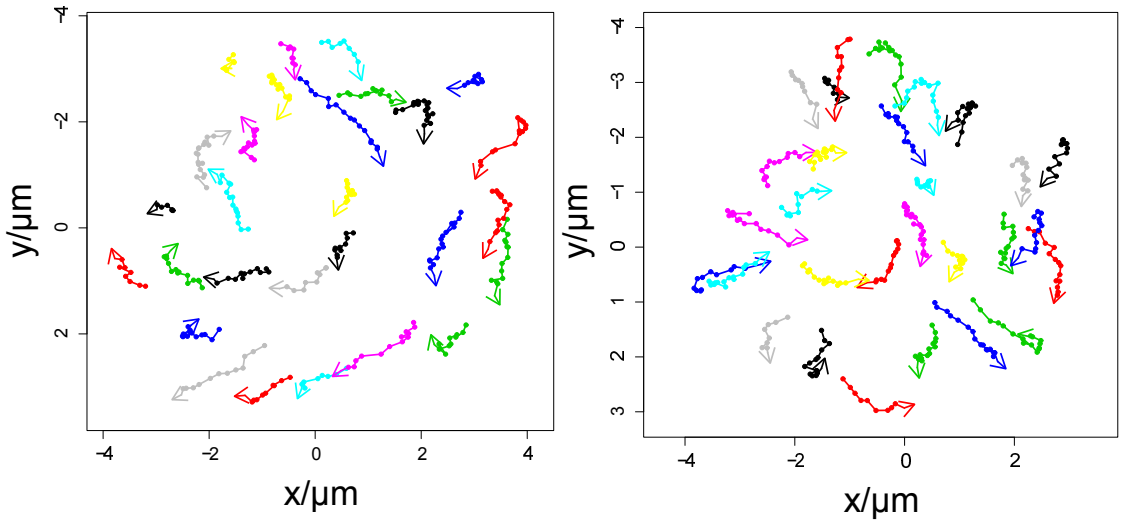
Slika 2.7: Usporedba rezultata. a) histogram rezultata za sve tri skupine: Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva, p=p vrijednost t-testa uz nul-hipotezu da je srednja vrijednost 0, zadnji brojevi su rezultat u zapisu težinska srednja vrijednost ± SEM. Zadnji red legende su p vrijednost t-testova na jednakost dvaju uzoraka. br,bg,rg=p vrijednosti testova usporedbe između plave i crvene, plave i zelene, crvene i zelene skupine. b) Prikaz srednjih vrijednosti ± SEM za sve tri skupine uzoraka. Crvenom bojom prikazani su rezultati dobiveni prvo računanjem težinske srednje vrijednosti stanice pa potom računanja ukupne srednje vrijednosti. Plavom bojom označeni su rezultati dobiveni težinskim usrednjavanjem svežnjeva iz svih stanica.

Obzirom na sličan iznos efekta u dvije različite stanične populacije, zaključujemo da kiralnost diobenog vretena postoji i da nije svojstvena samo jednoj staničnoj vrsti.

3 Perturbacija heliciteta u diobenom vretenu mijenjanjem aktivnosti motornog proteina kinezina 5

U uvodu je opisano na koje načine motorni proteini mogu interagirati s mikrotubulima i djelovati silama na njih. U ovom slučaju, motorni protein koji vjerojatno sudjeluje u generiranju heliciteta svežnjeva jest Eg5 (kinezin 5). Razlog ciljanja ovog motora jest što je pokazano da on hoda po površini mikrotubula na način da preferira gibanje ulijevo [19] pa bi stoga mogao sudjelovati u uvijanju svežnjeva mikrotubula. Stoga, s ciljem istraživanja mehanizma zakretanja svežnjeva mikrotubula diobenog vretena, smanjujemo aktivnost tog motora i promatramo promjene u zakretanju svežnjeva.

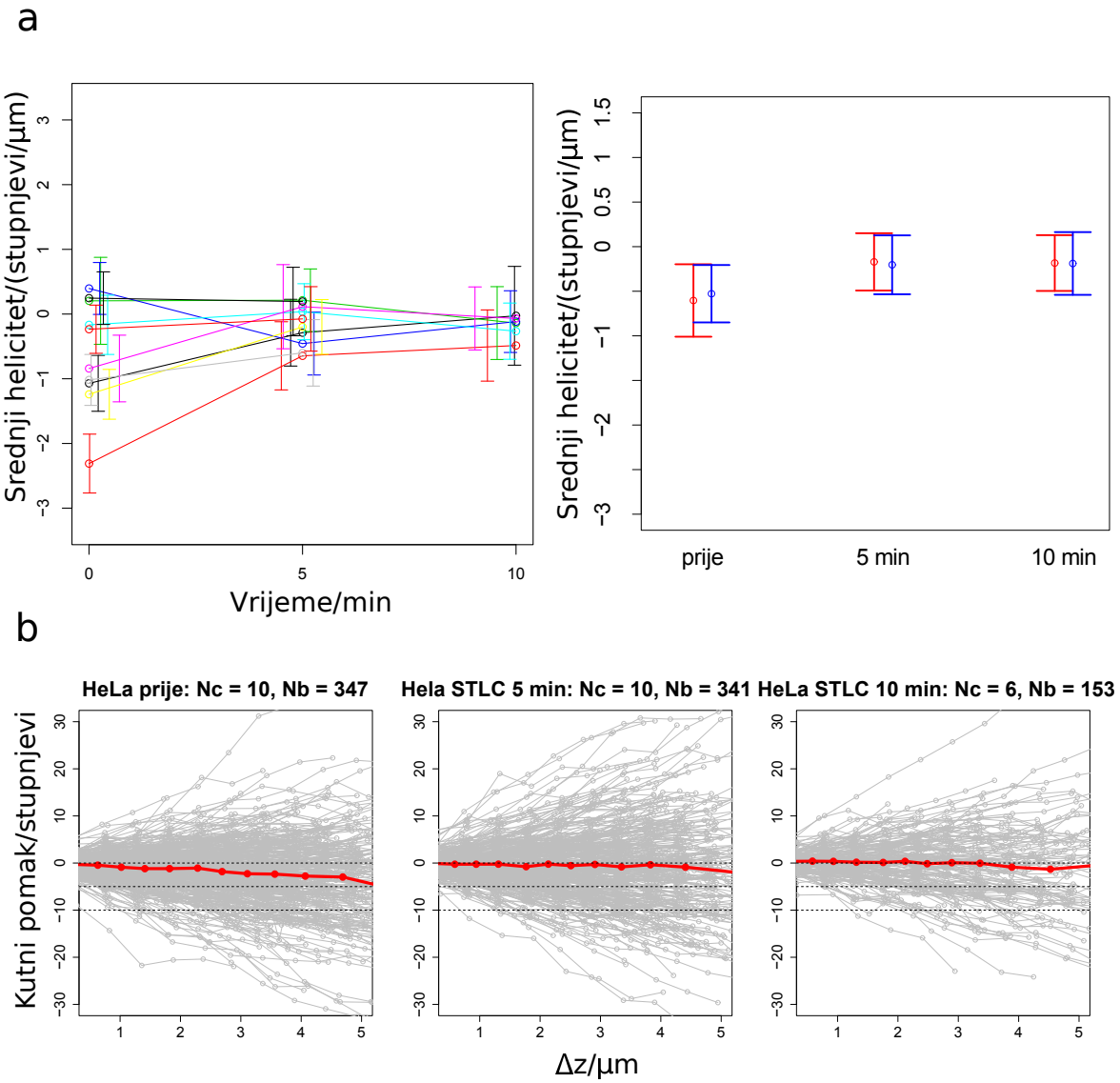
3.1 Tretiranje stanica STLC-em



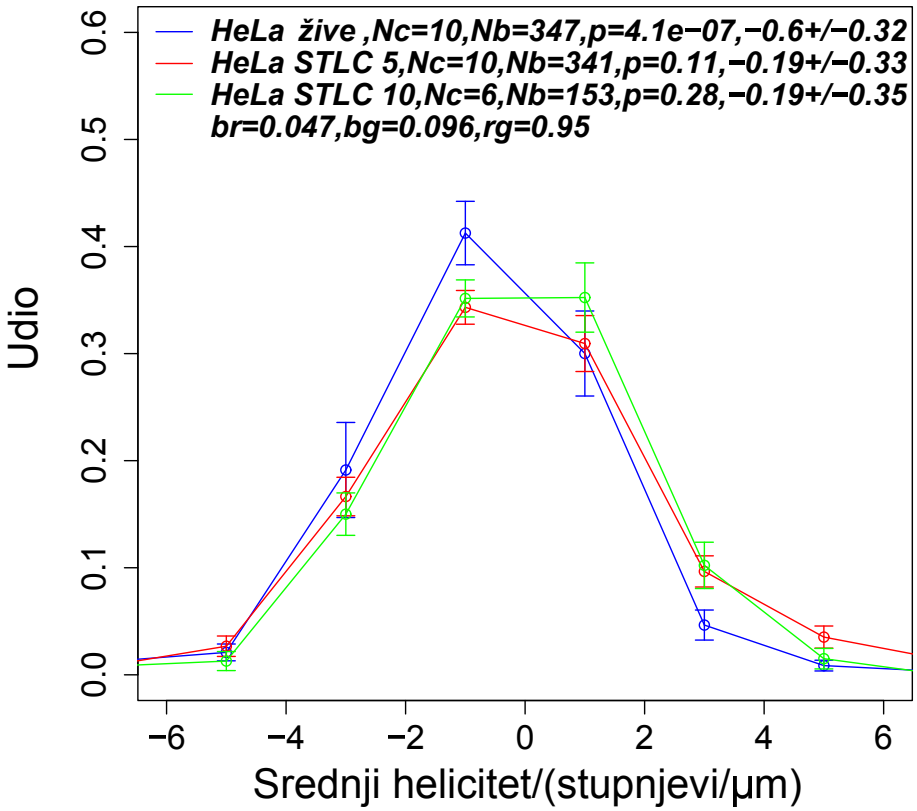
Slika 3.8: Utjecaj STLC-a na oblik svežnjeva. Tlocrti ispraćenih točki stanice prije (lijevo) i 5 minuta nakon (desno) dodavanja STLC-a.

Prva perturbacija napravljena je dodavanjem suspstance zvane STLC koja uzrokuje odvajanje kinezina 5 od mikrotubula. Mjeren je helicitet prije tretmana te 5 i 10 minuta nakon tretmana. Kod stanica koje su prije pokazivale postojanje heliciteta vidljivo je njegovo smanjenje već nakon 5 minuta (Slika 3.8, Slika 3.9a lijevo). 10 minuta nakon tretmana nema značajne promjene u odnosu na 5 minuta nakon tretmana. Očekivano, stanice koje su prije tretmana imale helicitet blizu 0 ostale su na

toj vrijednosti. U grupi prije dodavanja STLC-a vidimo razliku u standardnim pogreškama i srednjim vrijednostima koja se smanjuje nakon tretmana što je uz pomak srednje vrijednosti prema nuli dodatna potvrda smanjujućeg učinka STLC-a na helicitet (Slika 3.9a desno). Uspoređivanje grafova kutnog pomaka također upućuje na smanjenje srednje vrijednosti heliciteta vidljivo u izravnanju usrednjene linije nakon tretmana STLC-em (Slika 3.9b).

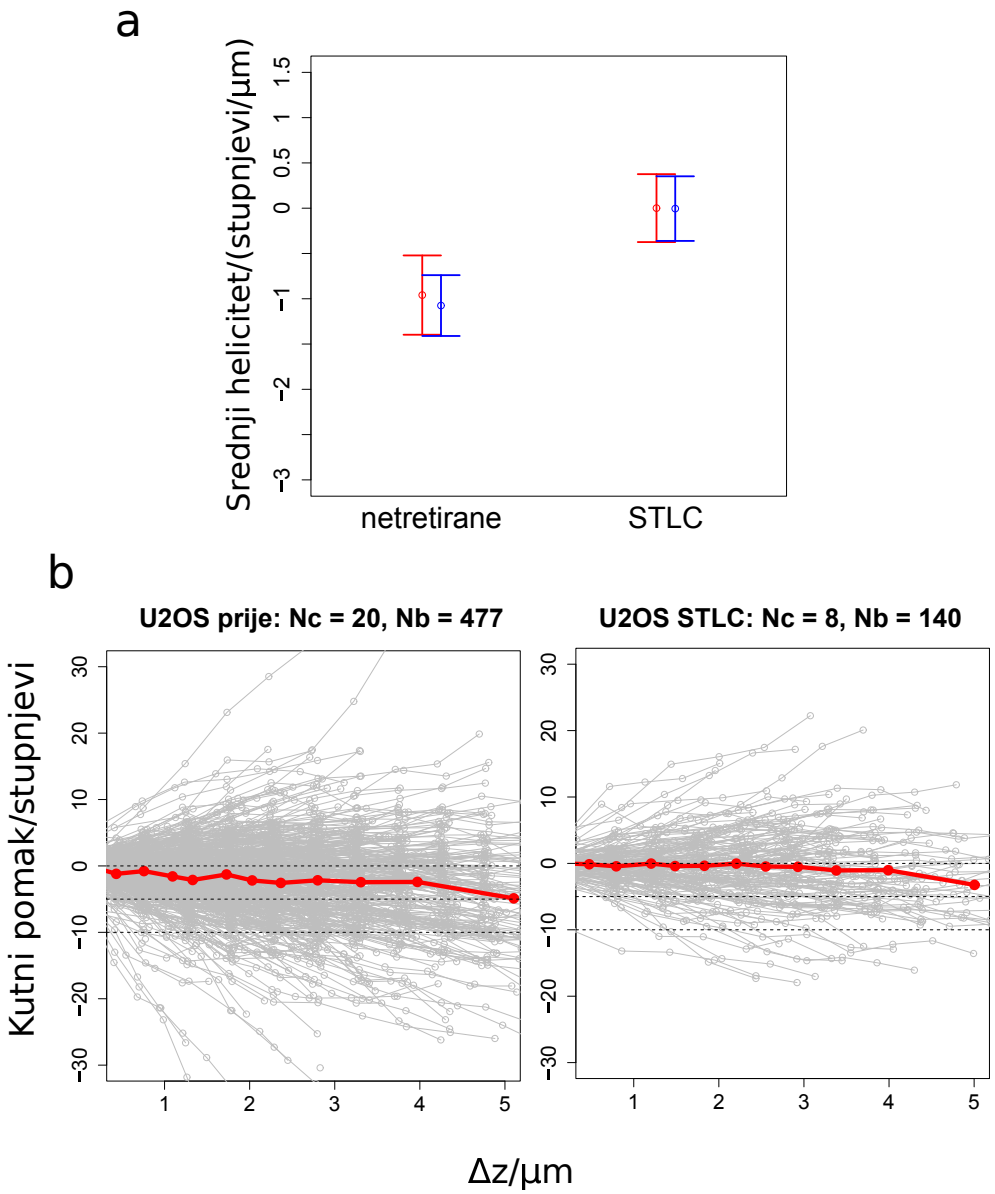


Slika 3.9: Rezultati analize nakon tretmana živih HeLa stanica STLC-em. a) Lijevo: Tezinske srednje vrijednosti heliciteta stanica ± SEM prije te 5 i 10 minuta nakon dodavanja STLC-a. Desno: Prikaz srednjih vrijednosti ± SEM za sve tri skupine uzoraka s lijevog grafa. Crvenom bojom prikazani su rezultati dobiveni prvo računanjem težinske srednje vrijednosti stanice pa potom računanja ukupne srednje vrijednosti. Plavom bojom oznaceni su rezultati dobiveni težinskim usrednjavanjem svežnjeva iz svih stanica. b) Grafovi kutnog pomaka obzirom na promjenu visine za sve tri grupe iz grafova pod a). Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva.



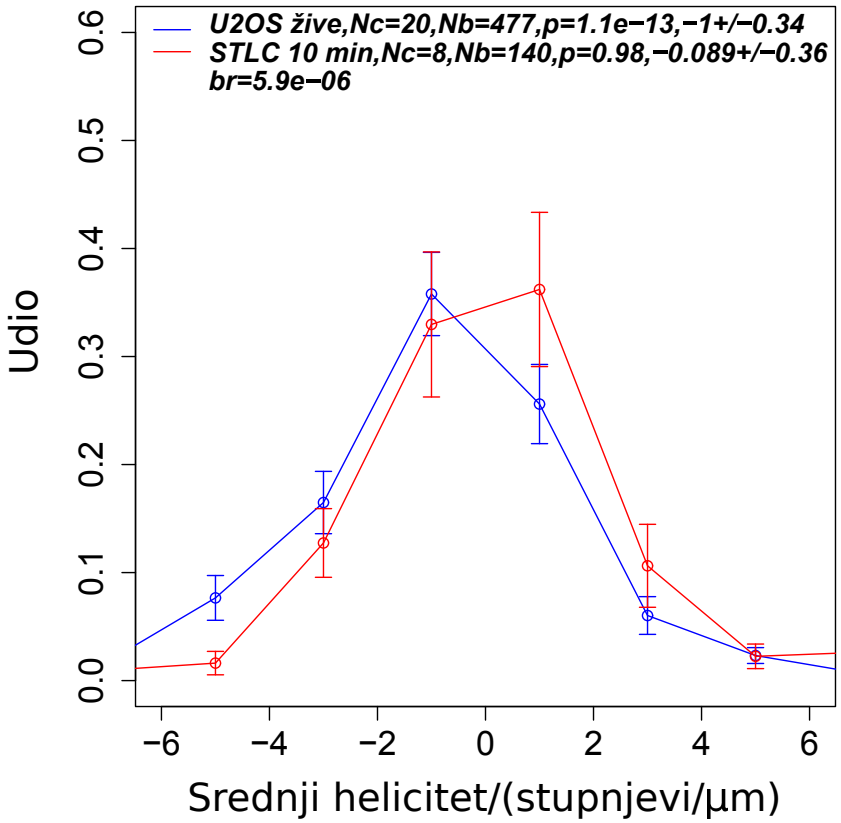
Slika 3.10: Usporedba histograma prije i nakon tretmana živih HeLa stanica STLC-em. Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva, p=p vrijednost t-testa uz nul-hipotezu da je srednja vrijednost 0, zadnji brojevi su rezultat u zapisu težinska srednja vrijednost ± SEM. Zadnji red legende su p vrijednost t-testova na jednakost dvaju uzoraka. br,bg,rg=p vrijednosti testova usporedbe između plave i crvene, plave i zelene, crvene i zelene skupine.

Uspoređivanjem histograma prije i nakon tretmana STLC-em, već na prvi pogled vidimo pomak srednjih vrijednosti prema nuli nakon tretmana (Slika 3.10). Ovaj utisak potvrđen je i p vrijednostima t-testova koji uspoređuju srednje vrijednosti uzoraka s nulom iz kojih zaključujemo kako za skupinu prije tretmana možemo odbaciti hipotezu da je srednja vrijednost nula na razini značajnosti od 5%, dok za skupine nakon tretmana ne možemo. T-testovi usporedbi grupa također ukazuju sličnost između grupa 5 i 10 minuta nakon tretmana te razliku u odnosu na grupu prije tretmana. Razlog zašto je p vrijednost testa usporedbe grupe prije s grupom 5 min nakon tretman različita od p vrijednosti testa usporedbe grupe prije s grupom 10 min nakon tretmana uz praktički identične srednje vrijednosti i standardne pogreške u obje grupe leži u manjem broju uzoraka u grupi 10 min nakon tretmana. No, uzmemo li u obzir da su srednje vrijednosti i distribucije histograma gotovo identične i 5 min i 10 min nakon tretmana, razumno je pretpostaviti da bi se i p vrijednosti usporednih testova izjednačile izjednačavanjem broja uzoraka u skupinama.



Slika 3.11: Usporedba rezltata prije i nakon tretmana živih U2OS stanica STLC-em. a) Prikaz srednjih vrijednosti ± SEM za sve tri skupine uzoraka s lijevog grafa. Crvenom bojom prikazani su rezultati dobiveni prvo računanjem težinske srednje vrijednosti stanice pa potom računanja ukupne srednje vrijednosti. Plavom bojom označeni su rezultati dobiveni težinskim usrednjavanjem svežnjeva iz svih stanica. b) Grafovi kutnog pomaka obzirom na promjenu visine za obje grupe iz grafova pod a). Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva.

Isti tretman primijenjen je i na žive tubulinom označene U2OS stanice. Budući ovdje nismo proučavali iste stanice prije i nakon dodavanja STLC-a, prvu grupu čine sve kvantificirane netretirane stanice (ista skupina kao i U2OS skupina sa slike 2.7). Nakon dodavanja STLC-a vidimo kao i ranije pomak srednjih vrijednosti prema nuli kao i izjednačavanje standardnih pogreški dviju metoda računanja srednjih vrijednosti. (Slika 3.11a). Isti efekt vidljiv je i na grafovima kutnog pomaka (Slika 3.11b).

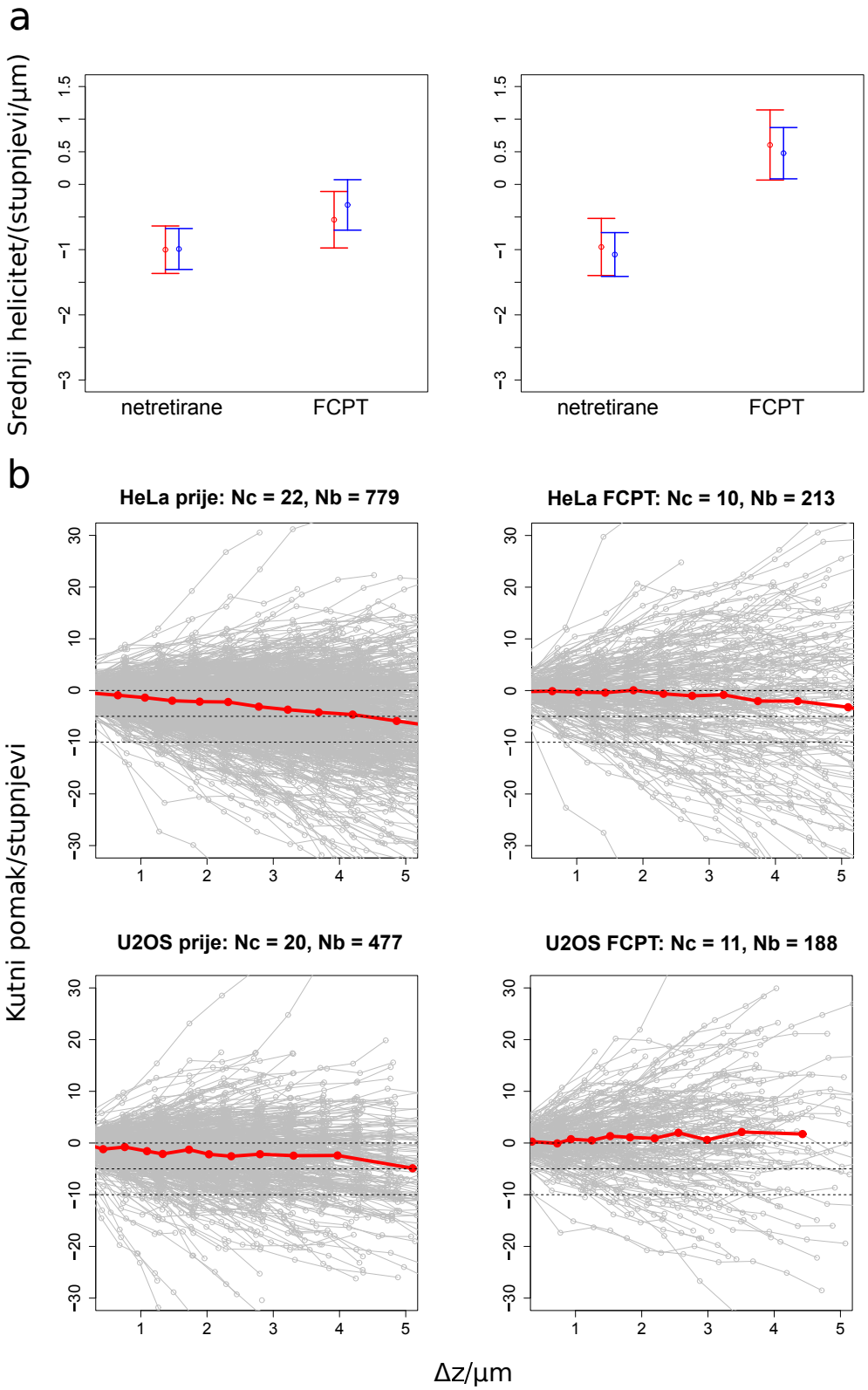


Slika 3.12: Usporedba histograma prije i nakon tretmana živih U2OS stanica STLC-em. Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva, p=p vrijednost t-testa uz nul-hipotezu da je srednja vrijednost 0, zadnji brojevi su rezultat u zapisu težinska srednja vrijednost $\pm$ SEM. Zadnji red legende su p vrijednost t-testova na jednakost dvaju uzoraka. br,bg,rg=p vrijednosti testova usporedbe između plave i crvene, plave i zelene, crvene i zelene skupine.

Kao i ranije, t-testovi potvrđuju da je skupina prije tretmana srednjeg heliciteta različitog od 0, dok kod skupine s dodanim STLC-em jako velika p vrijednost ne dozvoljava odbacivanje nul-hipoteze (Slika 3.12). Zaključujemo kako su rezultati konzistentni s rezultatima za HeLa stanice.

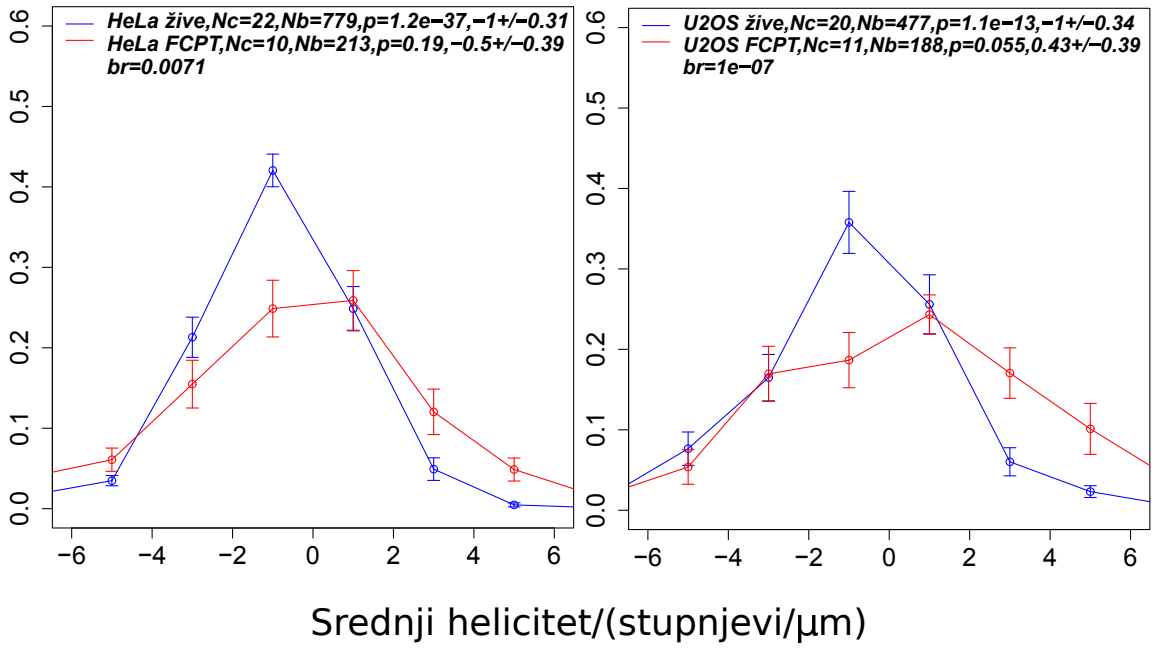
3.2 Tretiranje stanica FCPT-om

Nakon primjenjivanja STLC-a kako bismo odlijepili kinezin 5 od mikrotubula, pravimo drugačiji pristup i tretiramo vretena supstancom zvanom FCPT koja fiksira položaj kinezina 5 na mikrotubulu. Kod obje vrste stanica vidimo smanjenje iznosa heliciteta, uz poprilično povećanje standardne pogreške, pogotovo kod načina računanja u kojemu su prvo usrednjavane pojedinačne stanice (Slika 3.13a). Isto povećanje vidi se još zornije i u grafovima kutnog pomaka u kojima je uočljivo širenje distribucije svežnjeva.



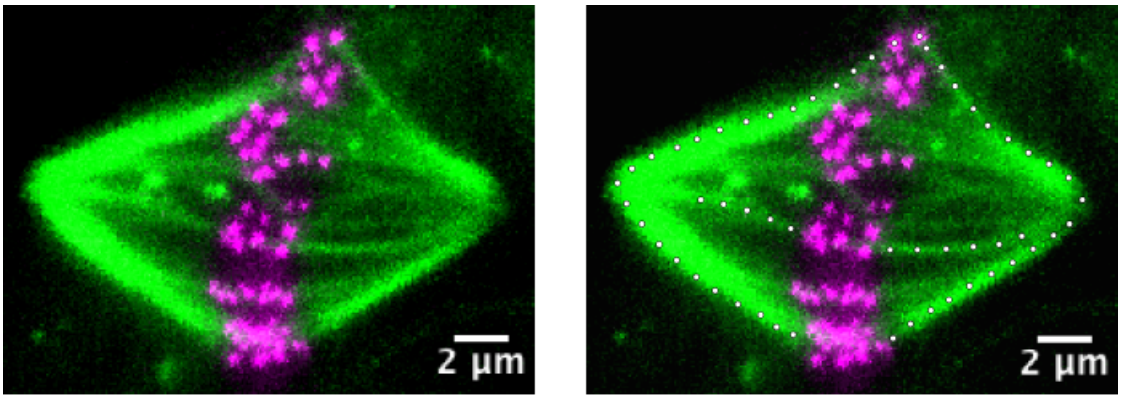
Slika 3.13: Usporedba rezultata prije i nakon tretmana živih HeLa i U2OS stanica FCPT-om. a) Prikaz srednjih vrijednosti ± SEM za HeLa (lijevo) i U2OS (desno) skupinu. Crvenom bojom prikazani su rezultati dobiveni prvo računanjem težinske srednje vrijednosti stanice pa potom računanja ukupne srednje vrijednosti. Plavom bojom označeni su rezultati dobiveni težinskim usrednjavanjem svežnjeva iz svih stanica. b) Grafovi kutnog pomaka obzirom na promjenu visine za obje grupe iz grafova pod a). Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva.

Ovo smanjenje je stoga više posljedica neuređenosti koju ova susptanca stvara u sustavu, nego nekog usmjerenog pomaka prema manjem helicitetu kao što smo vidjeli kod tretmana STLC-em. Iste zaključke možemo izvući i iz histograma heliciteta i p vrijednosti napravljenih testova (Slika 3.14).



Slika 3.14: Usporedba histograma prije i nakon tretmana živih HeLa i U2OS stanica FCPT-om. Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva, p=p vrijednost t-testa uz nul-hipotezu da je srednja vrijednost 0, zadnji brojevi su rezultat u zapisu težinska srednja vrijednost ± SEM. Zadnji red legende su p vrijednost t-testova na jednakost dvaju uzoraka. br,bg,rg=p vrijednosti testova usporedbe između plave i crvene, plave i zelene, crvene i zelene skupine.

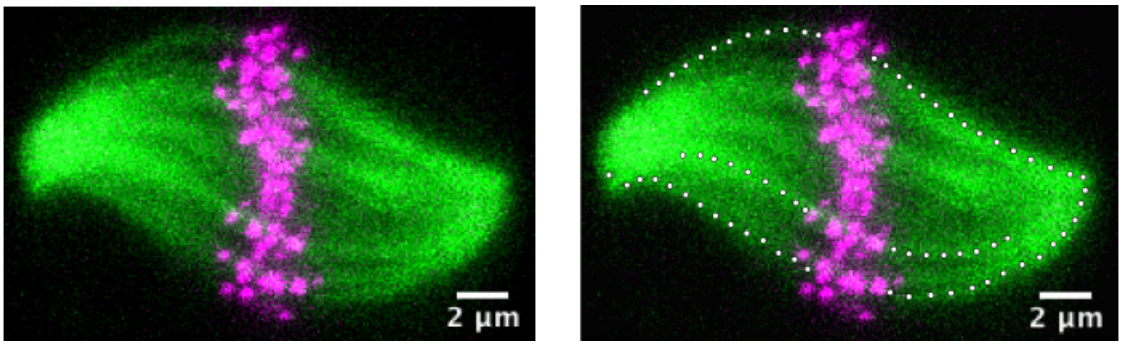
Perturbacija FCPT-om imala je vidljiv učinak i u horizontalnim vretenima (Slika 3.15). Vanjski mikorotubuli postali su ravni i cijelo vreteno poprimilo je oblik dijamanta. Uz ovakvu promjenu na horizontalnim vretenima, uz srednju vrijednost heliciteta bližu nuli, očekivali bismo i užu raspodjelu oko te vrijednosti. Mogući razlog zašto ovdje vidimo veće devijacije oko srednje vrijednosti je osjetljivost odgovora stanice na dodavanje FCPT-a ovisno o staničnoj fazi. Inače se za identifikaciju stanične faze služimo promatranjem položaja kinetohora, no FCPT djeluje na način da raštrka kinetohore pa se zamagljuje informacija o fazi. Način za uklanjanje ove pogreške bio bi pravljenje studije kao kod STLC tretmana, gdje su promatrane iste stanice prije i nakon dodavanja supstance. Tako bismo mogli identificirati staničnu fazu prije perturbacije i onda biti sigurni da promatramo što želimo.



Slika 3.15: Horizontalno U2OS vreteno tretirano FCPT-om. Zelenom bojom označen je signal tubulina, a ljubičastom signal kinetohora. Bijelim točkama ispraćeni su karakteristični oblici.

3.3 Overekspresija kinezina 5

Za kraj, napravljena je i overkspresija kinezina 5, tj. povećan je broj tih motora u vretenu bez zadiranja u njihovu funkcionalnost. Ova perturbacija rezultirala je izduženim vretenima koja cijela poprimaju oblik slova S pa stoga sada čak i vanjski mikrotubuli imaju S-oblik (Slika 3.16).

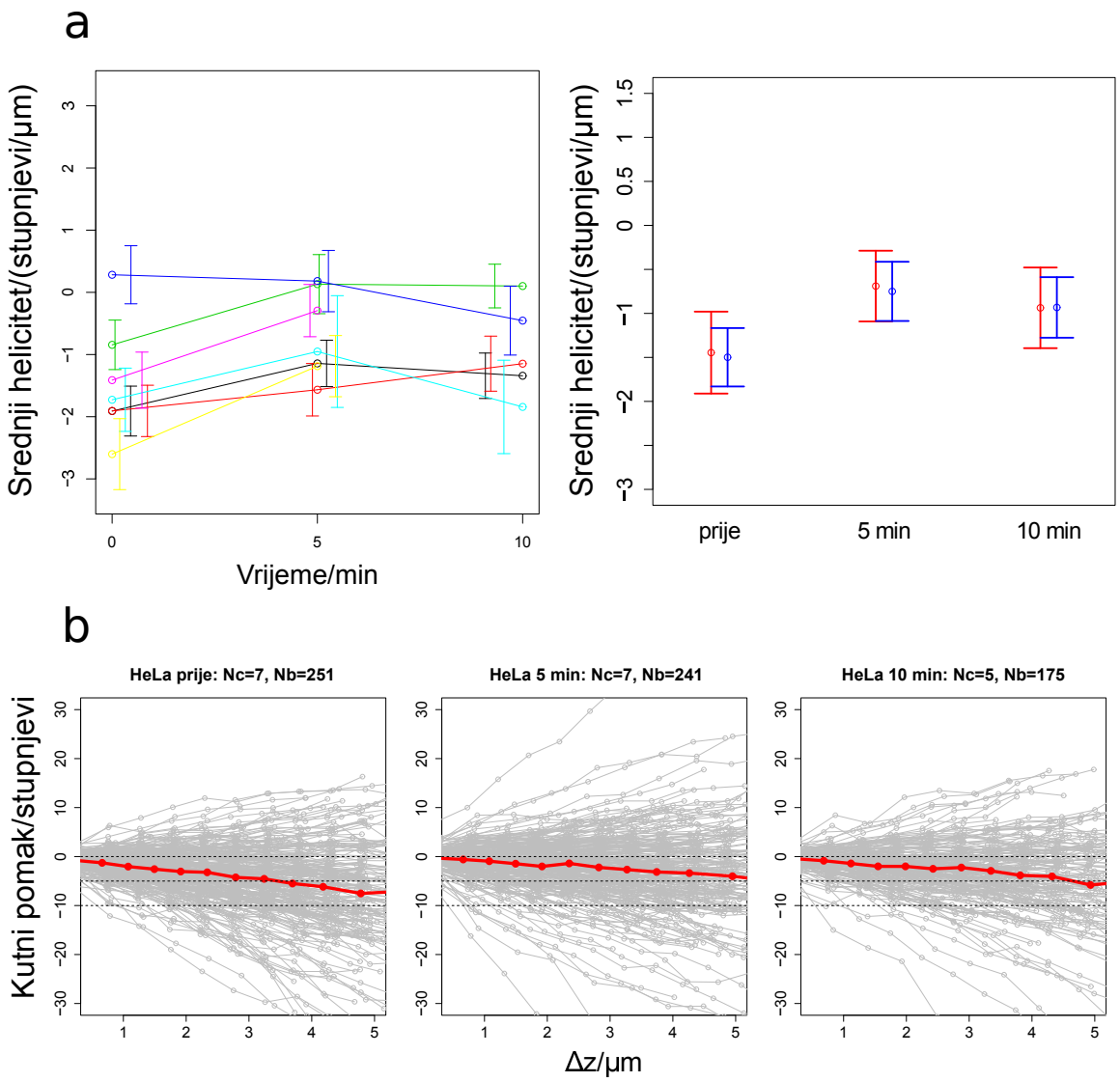


Slika 3.16: Horizontalno U2OS vreteno s overeksprimiranim kinezinom 5 Zelenom bojom označen je signal tubulina, a ljubičastom signal kinetohora. Bijelim točkama ispraćeni su karakteristični oblici.

Nijedno ovakvo vertikalno vreteno nije uočeno, no sudeći po obliku horizontalnog vretena, efekt bi trebao biti povećanje srednjeg heliciteta, što je suprotno djelovanju STLC-a i FCPT-a. Uz pretpostavku da je kinezin 5 jedan od ključnih čimbenika za stvaranje heliciteta, ovo je i intuitivan rezultat, jer smo STLC-em i FCPT-om smanjili aktivnost tog motora, dok ju overekspresija povećava.

3.4 *Kontrola*

Kako bismo bili sigurni da gore navedeni tretmani stvarno prave razliku u odnosu na normalno ponašanje vretena, analizirana je i kontrolna skupina PRC1 obilježenih HeLa stanica u tri vremena razmaknuta 5 minuta (Slika 3.17a). Vidimo vrlo različito ponašanje u odnosu na sliku 3.9a. Umjesto da helicitet ide u nulu nakon 5 i 10 minuta, sada se helicitet mijenja puno manje u odnosu na početnu vrijednost i to ne nužno u istom smjeru.



Slika 3.17: Rezultati analize kontrolne skupine živih HeLa stanica. a) Lijevo: Tezinske srednje vrijednosti heliciteta stanica ± SEM prije te nakon 5 i 10 minuta. Desno: Prikaz srednjih vrijednosti ± SEM za sve tri skupine uzoraka s lijevog grafa. Crvenom bojom prikazani su rezultati dobiveni prvo računanjem tezinske srednje vrijednosti stanice pa potom racunanja ukupne srednje vrijednosti. Plavom bojom oznaceni su rezultati dobiveni težinskim usrednjavanjem svežnjeva iz svih stanica. b) Grafovi kutnog pomaka obzirom na promjenu visine za sve tri grupe iz grafova pod a). Nc = broj stanica, Nb = broj svežnjeva

Trend opstanka heliciteta prolaskom vremena vidi se i u grafovima promjene kuta. Za razliku od STLC slučaja (Slika 3.9b), sada u sva tri vremena vidimo da usrednjena linija pokazuje negativan nagib. Određene razlike u srednjim helicitetima s prolaskom vremena treba očekivati i zbog stvarne promjene vretena, ali još više zbog rotacije cjelokupnog vretena. Naime, kako vrijeme prolazi, vreteno izlazi iz početnog vertikalnog položaja te tako otežava praćenje svežnjeva što često rezultira blagim promjenama u srednjem helicitetu.

Zaključujemo kako težnja srednjeg heliciteta u 0 stupnjeva/μm nije pojava koja se neprisilno događa u stanici, već je rezultat smanjenja aktivnosti kinezina 5 dodavanjem STLC-a i FCPT-a u stanicu.

4 Teorijski model

Cilj ovog modela [20] je reproducirati oblike mikrotubula viđene u eksperimentu i tako odrediti sile i momente sila potrebne za njihov nastanak. Jedan svežanj u modelu je opisan kao homogeni štap duljine L na čijem jednom kraju (ovdje odabran lijevi kraj) djeluju proizvoljna sila ($\mathbf{F_0}$) i moment sile ($\mathbf{M_0}$). Sila i moment sile na drugom kraju određeni su uvjetom statičke ravnoteže. Štap je opisan duljinom konture s do promatrane točke na štapu, vektorom udaljenosti od promatrane točke na štapu do ruba $\mathbf{r}$, tangencijalnim vektorom $\mathbf{t}$, kutem uvijanja poprečnog presjeka ϕ te krutošću na savijanje i uvijanje κ i τ (Slika 4.18a). Jednadžba koju rješavamo naziva se Kirchoffova statička jednadžba [21]:

$$\kappa\big(\mathbf{t}(s) \times \frac{d\mathbf{t}(s)}{ds}\big) + C_{tw}\mathbf{t}(s) = \mathbf{r}(s) \times \mathbf{F_0} - \mathbf{M_0}, \tag{4.1}$$

gdje je $C_{tw} = \tau\frac{d\phi}{ds}$ i ima dimenziju momenta sile. Uvjet statičke ravnoteže nalaže:

$$\mathbf{M_r} = \mathbf{L} \times \mathbf{F_0} - \mathbf{M_0},\ \mathbf{F_r} = -\mathbf{F_0} \tag{4.2}$$

gdje su $\mathbf{M_r},\ \mathbf{F_r}$ moment sile i sila na desnom kraju štapa. Raspisivanjem 4.1 u Kartezijevim koordinatama, dobivamo

$$\kappa y'(s)z''(s) - \kappa z'(s)y''(s) + C_{tw}x'(s) = -F_{0z}y(s) + F_{0y}z(s) - M_{0x} \tag{4.3a}$$

$$\kappa z'(s)x''(s) - \kappa x'(s)z''(s) + C_{tw}y'(s) = -F_{0x}z(s) + F_{0z}x(s) - M_{0y} \tag{4.3b}$$

$$\kappa x'(s)y''(s) - \kappa y'(s)x''(s) + C_{tw}z'(s) = -F_{0x}y(s) + F_{0y}x(s) - M_{0z}, \tag{4.3c}$$

s tim da $'$ označava derivaciju obzirom na konturnu duljinu s. Rješenja ove jednadžbe za oblike s proizvoljno velikim nagibima kontura postoje [22], ali su jako kompli-cirana pa je teško steći uvid u ponašanje oblika mijenjanjem ulaznih parametara. Kako bismo došli do intuitivnijih rješenja, pravimo aproksimaciju malih kuteva. Drugim riječima, ograničavamo se na male promjene oblika obzirom na smjer u kojem je štap položen (ovdje x smjer pa uvjetujemo $\frac{ds}{dx} \approx 1$). Primjenom navedene aproksimacije,

gornji sustav jednadžbi značajno se pojednostavljuje:

$$C_{tw} = -M_{0x} \tag{4.4a}$$

$$-\kappa z''(x) + C_{tw} y'(x) = F_{0x} z(x) - F_{0z} x - M_{0y} \tag{4.4b}$$

$$\kappa y''(x) + C_{tw} z'(x) = -F_{0x} y(x) + F_{0y} x - M_{0z}. \tag{4.4c}$$

Redefiniranjem koordinatnog sustava tako da smjer yz projekcije momenta sile $\mathbf{M_0}$ proglasimo novim z smjerom, komponenta M_{0y} nestaje pa M_{0z} možemo zvati savijajućim, a M_{0x} uvijajućim momentom sile. Važno je napomenuti da postojanje uvijajućeg momenta sile M_{0x} nije jedini način dobivanja vanravninskih oblika, već oni mogu nastati i uz iščezavajući uvijajući moment sile, uz postojanje savijajućih momenata na krajevima štapa koji ne leže na paralelnim osima. Sada analitička rješenja možemo zapisati u obliku:

$$\begin{aligned} y(x) = A_1 \sin\left(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}\right) \cos\left(\frac{\omega_2 x + \phi_2}{2}\right) \\ + A_2 \cos\left(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}\right) \sin\left(\frac{\omega_2 x + \phi_2}{2}\right) - \frac{M_{0z}}{F_{0x}} - \frac{F_{0y} x}{F_{0x}} \end{aligned} \tag{4.5a}$$

$$\begin{aligned} z(x) = A_1 \sin\left(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}\right) \sin\left(\frac{\omega_2 x + \phi_2}{2}\right) \\ - A_2 \cos\left(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}\right) \cos\left(\frac{\omega_2 x + \phi_2}{2}\right) - \frac{M_{0x} F_{0y}}{F_{0x}^2}, \end{aligned} \tag{4.5b}$$

uz

$$\omega_1 = \frac{\sqrt{M_{0x}^2 + 4\kappa F_{0x}}}{\kappa} \tag{4.6a}$$

$$\omega_2 = -\frac{M_{0x}}{\kappa}. \tag{4.6b}$$

Ako znamo $F_{0x}, M_{0z}, M_{0x}, L$ i κ, možemo odrediti rješenja uz sljedeće rubne uvjete:

$$\mathbf{r}(0) = 0 \tag{4.7a}$$

$$\mathbf{r}(L) = L\hat{x}. \tag{4.7b}$$

Poučno je naglasiti par specijalnih slučajeva. Na primjer, za iščezavajući moment uvijanja (M_{0x}) i paralelne momente savijanja istog iznosa (M_{0z}), dobivamo ravninski S oblik (Slika 4.18c). Ovo se lijepo vidi iz dobivenih rješenja 4.5a i 4.5b jer u navednom

slučaju $\omega_2, A_2, \phi_2 \to 0$, pa rješenja postaju ravninska:

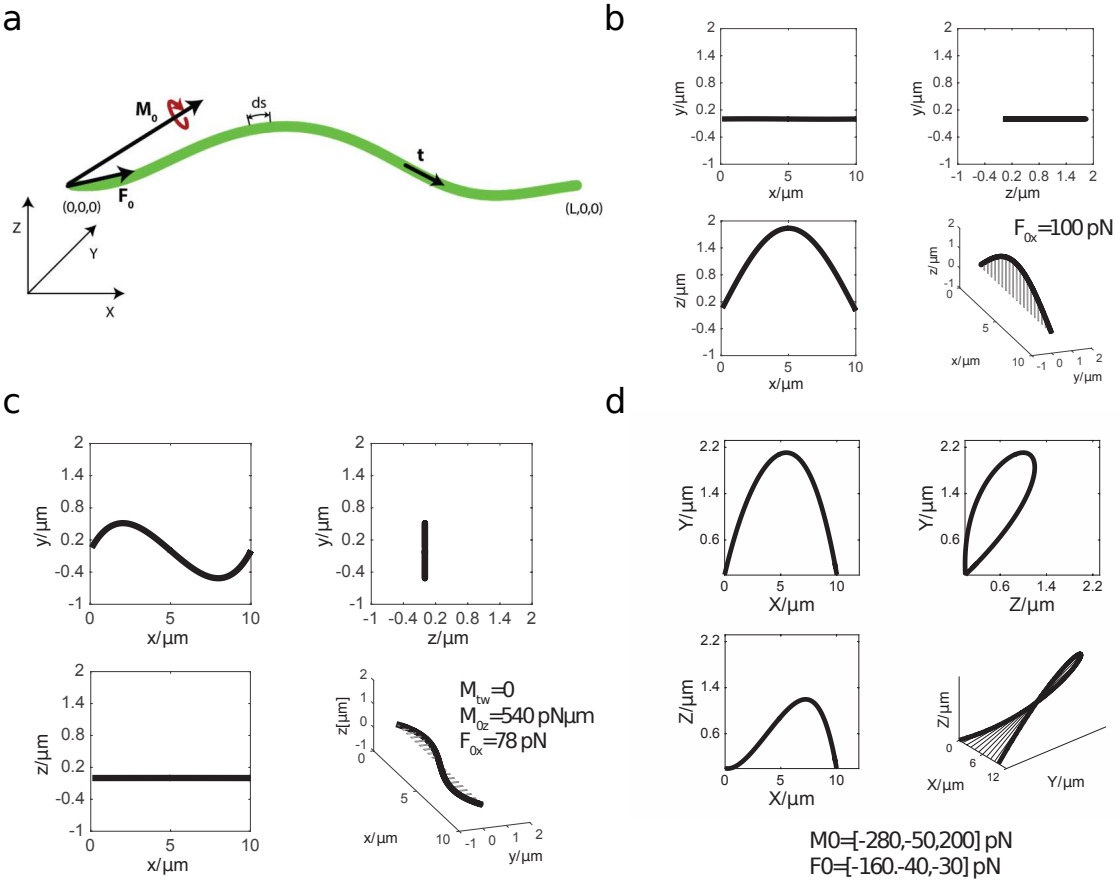
$$y(x) = A_1 \sin\left(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}\right) - \frac{M_{0z}}{F_{0x}} - \frac{F_{0y}x}{F_{0x}} \tag{4.8a}$$

$$z(x) = 0, \tag{4.8b}$$

uz

$$F_{0y} = \frac{2M_{0z}}{L},\ F_{0z} = 0 \tag{4.9}$$

određene zahtjevom ravnoteže sila. U analognom slučaju, samo uz antiparalelne momente uvijanja, dobili bismo ravninski C oblik (Slika 4.18b). Najopćenitiji oblik odgovara stisnutom heliksu (Slika 4.18d).



Slika 4.18: Teorijski model. a) Shema parametara modela. b), c), d) 3D prikaz ravninskog C oblika, ravninskog S oblika i općenitog oblika dobivenog mješavinom ulaznih parametara te projekcija tih oblika na tri ravnine definirane koordinatnim sustavom sa gornje sheme. Iz [20].

Zaključujemo kako model može objasniti i ravninske i vanravninske oblike svežnjeva kombiniranjem sila i momenata sila na krajevima svežnja. Bitno je naglasiti kako

se vanravninski oblici ne mogu dobiti bez djelovanja momenata sila na rubovima. Uz rezultate perturbacije motornog proteina kinezina 5, nameće se zaključak kako upravo motorni proteini stvaraju uvijajuće momente u svežnjevima.

5 Zaključak

Diobeno vreteno je stanična struktura čiji je zadatak ravnomjerno raspodijeliti genetski materijal u staničnoj diobi. Kako bismo ga bolje razumjeli, proučavamo mu oblik i iz njega učimo o mehanizmu kojim su ti oblici nastali. Korištenjem STED superrezolucijske mikroskopije, uz standardne udžbeničke C oblike svežnjeva, u horizontalnim vretenima primijećeni su i svežnjevi koji oblikom podsjećaju na slovo S. Kako bismo dodatno istražili uočene oblike, promatrana su vertikalna vretena korištenjem standardne konfokalne mikroskopije. Proučavane su tri skupine ljudskih stanica. HeLa stanice fiksirane u metafazi te žive HeLa i U2OS stanice. U HeLa stanicama bio je fluorescentno obilježen PRC1 protein prisutan kod antiparalelnih svežnjeva. U U2OS stanicama obilježen je bio tubulin - osnovna gradivna jedinica mikrotubula. U sve tri skupine primijećena je kiralnost mjerenjem srednjeg heliciteta svežnjeva mikrotubula diobenog vretena. Za žive stanice srednji helicitet iznosio je -1 stupanj/μm, dok je kod fiksiranih stanica bio dvostruko veći. Budući je efekt primijećen u dvije različite stanične vrste i istog je iznosa, zaključujemo kako postoji te nije specifičnost jedne stanične vrste ili nuspojava obilježavanja nekog proteina. Iako je kod fiksiranih stanica efekt ostao istog smjera, dvostruko veći iznos ukazuje da proces fiksacije povećava zakretanje svežnjeva u vretenu.

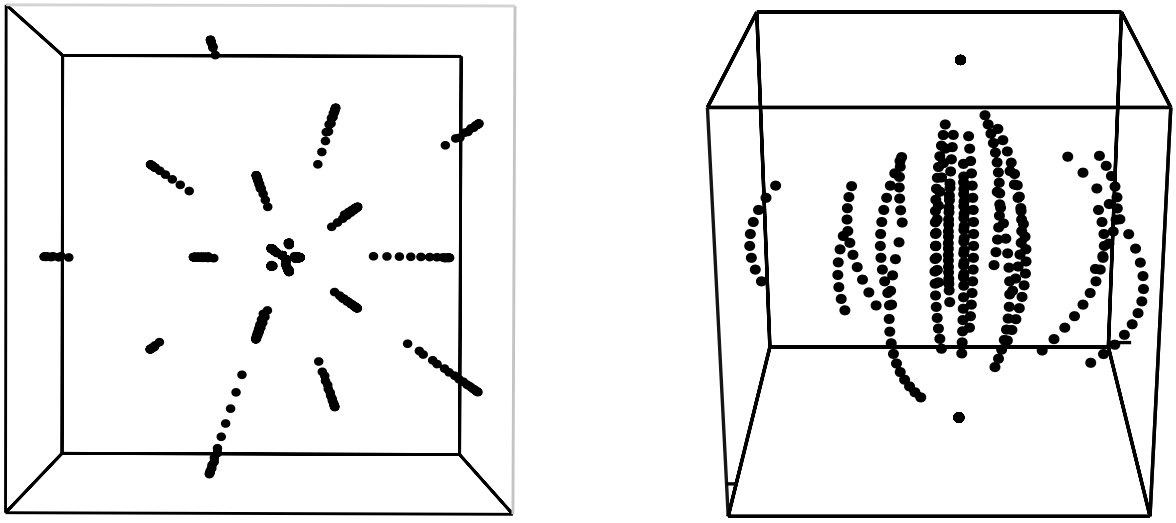
Budući je poznato da motorni proteini mogu djelovati silama na mikrotubule, kako bismo saznali više o mehanizmu nastanka heliciteta svežnjeva, perturbiran je motorni protein kinezin 5 (Eg5). Razlog odabira baš ovog motornog proteina jest što je pokazano da pri usmjerenom hodanju po površini mikrotubula taj motor kruži oko njegove osi [19]. Izvršene su tri manipulacije aktivnosti kinezina 5. Vreteno je prvo tretirano STLC-em, supstancom koja odljepljuje kinezin 5 s mikrotubula. Analizom je utvrđeno pomicanje srednje vrijednosti heliciteta prema nuli. Potom je aktivnost kinezina 5 smanjena FCPT supstancom koja lijepi kinezin 5 za mikrotubul ne dozvoljavajući mu daljnje pomicanje. Ovdje je također uočeno smanjenje srednjeg heliciteta. Razlika u odnosu na STLC skupinu je povećanje varijacije u srednjim helicite-

tima zasebnih stanica kao i povećanje varijacije heliciteta svežnjeva unutar stanica . Obzirom na ta opažanja, izgleda da je smanjenje heliciteta nakon tretmana vretena FCPT-om više posljedica neuređenosti koju ova supstanca stvara u vretenima. Za kraj je uvećana aktivnost kinezina 5 povećanjem broja tih motora (overekspresijom) bez zadiranja u njihovu funkcionalnost. Ovaj tretman imao je vidljive posljedice na izgled horizontalnih vretena koja su cijela pomprimila S oblik. Nažalost, nisu se mogla pronaći tako izdužena i zavijena vertikalna vretena, no sudeći po obliku viđenom u horizontalnom položaju vretena, očekivali bismo povećanje srednjeg heliciteta. Uz pretpostavku da je kinezin 5 jedan od ključnih čimbenika za stvaranje heliciteta, ovo je i intuitivan rezultat jer STLC i FCPT smanjuju aktivnost tog motora, a overekspresija ju povećava.

Izveden je i teorijski model s ciljem razumijevanja mehaničkih čimbenika potrebnih za nastanak eksperimentalno opaženih oblika. Svežanj mikrotubula u modelu je predstavljen kao homogen elastičan štap na čijem kraju djeluju proizvoljna sila i moment sile. Zaključak modela je kako se uočeni oblici mogu dobiti samo uz postojanje momenata sila. Uzme li se u obzir da smo uspijevali mijenjati srednji helicitet perturbiranjem aktivnosti kinezina 5, nameće se zaključak kako su upravo motorni proteini odgovorni za stvaranje momenata sila u svežnjevima mikrotubula diobenog vretena.

Dodaci

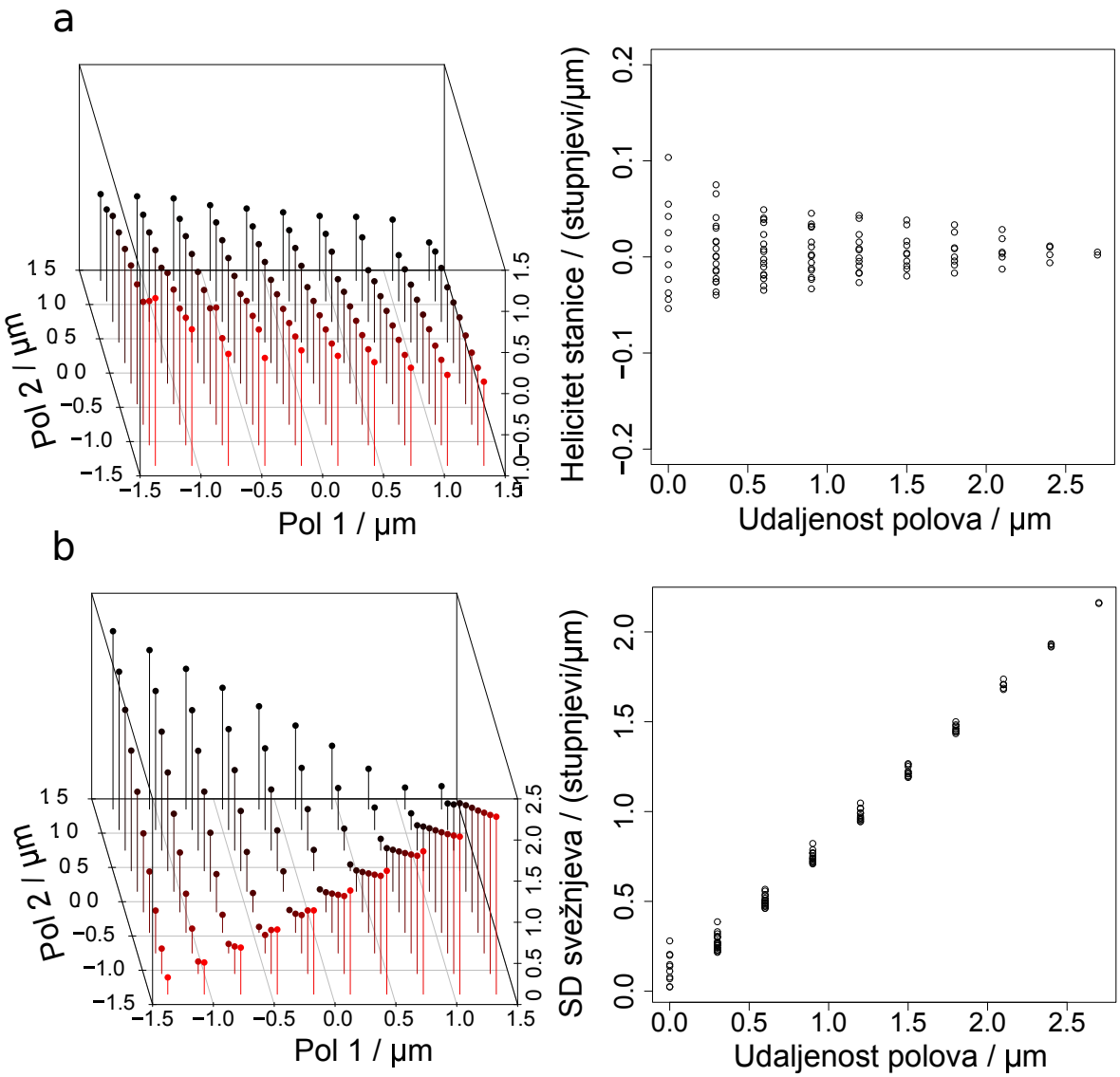
Dodatak A Diskusija greške metode



Slika A.1: Model diobenog vretena za analizu greške. Lijevo: tlocrt. Desno: bočni pogled.

U ovom dodatku proučit ćemo koliku grešku daje naša metoda obzirom na kvalitetu procjene položaja polova. U ovu svrhu napravljen je model potpuno simetričnog vretena čiji su svežnjevi potpuno ravninski, tj. nemaju helicitet (Slika A.1 lijevo). Kako bismo uzeli u obzir da svežnjevi nisu praćeni svi u istom intervalu visine, početna i konačna visina praćenja su određeni nasumično unutar zadanog intervala. Područje oko polova je ostavljeno nedostupno jer ga kod PRC1 obilježenih stanica jako slabo vidimo, a kod tubulinom obilježenih stanica je signal pregust pa se ne mogu razlikovati individualni svežnjevi (Slika A.1 desno).

Nakon konstruiranja modela, na njemu je pravljena analiza heliciteta svežnjeva za različite kombinacije procjene polova. Očekivano, zbog simetričnosti vretena, srednje vrijednosti su ostale jako bliske nuli čak i za najveće pogreške (Slika A.2a). Ono što se mijenja pri pomicanju procijenjenih položaja polova jest standardna devijacija svežnjeva oko te vrijednosti (Slika A.2b). Ako se prisjetimo da smo pri procjeni greške zbog krivog postavljanja polova koristili kružnicu radijusa 0.8 μm, vidimo da bismo za tu vrijednost uz potpuno simetrično vreteno dobili standardnu devijaciju od otprilike 1.3 stupnja/μm. Ove ograničenja metode treba imati na umu pri promatranju distribucije podataka u pokazanim histogramima.



Slika A.2: Rezultati analize modela vretena za različite kombinacije položaja polova. a) Srednje vrijednosti. Lijevo: 3D prikaz, desno: graf srednjih vrijednosti u ovisnosti o udaljenosti polova. b) Standardne devijacije (SD). Lijevo: 3D prikaz, desno: graf standardnih devijacija u ovisnosti o udaljenosti polova

Bibliography

[1] Pavin, N.; Tolić, I.M. Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle. // Annu Rev Biophys. Vol. 45 (2012), str. 279-298.

[2] Hawkins, T.; Mirigian, M.; Selcuk Yasar, M.; Ross JL. Mechanics of microtubules. // Journal of Biomechanics Vol. 43 (2010), str. 23–30, doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.09.005

[3] Dogterom, M.; Yurke, B. Measurement of the Force-Velocity Relation for Growing Microtubules. // Science Vol. 278 (1997), str. 856-860

[4] Vale, R.D.; Schnapp, B.J.; Reese, T.S.; Sheetz, M.P. Movement of organelles along filaments dissociated from the axoplasm of the squid giant axon. // Cell Vol. 40 (1985), str. 449–454.

[5] Pavin, N.; Tolic-Norrelykke, I.M. Dynein, microtubule and cargo: a ménage à trois. // Biochem Soc Trans Vol. 41 (2013), str. 1731-1735

[6] Rubinstein, B.; Larripa, K.; Sommi, P.; Mogilner A. The elasticity of motor-microtubule bundles and shape of the mitotic spindle. // Phys. Biol. Vol. 6 (2009)

[7] Sikirzhytski, V. et al. Direct kinetochore-spindle pole connections are not required for chromosome segregation. // Journal of Cell Biology Vol. 206 (2014), str. 231-243.

[8] Elting, M.W.; Hueschen, C.L.; Udy, D.B.; Dumont, S. Force on spindle microtubule minus ends moves chromosomes. // Journal of Cell Biology Vol. 206 (2014), str. 245–256.

[9] Kajtez, J. et al. Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores. // Nature Communications doi:10.1038/ncomms10298 (2016).

[10] Shema rada fluorescentnog mikroskopa, (15.5.2017.), `https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescencemicroscope`

[11] Presjek fluorescentnog mikropa, (15.5.2017.), http://www.leica-microsystems.com/science-lab/step-by-step-guide-to-fluorescence-microscopy/

[12] Stokeskov pomak, (15.5.2017.), http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html

[13] Fotoizbjeljivanje, (15.5.2017.), http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/fluorescence/photobleaching/

[14] Shema rada konfokalnog mikroskopa, (15.5.2017.), http://www.physics.emory.edu/faculty/weeks//confocal/

[15] Razlika slike dobivene epifluorescentnom i konfokalnom mikroksopijom, (15.5.2017.), http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/opticalsectioning/confocalwidefield/indexflash.html

[16] Shema postava konfokalnog fluorescentnog mikroskopa, (15.5.2017.), http://six.cheng.cam.ac.uk/wiki/index.php/Fluorescenceimaging

[17] N. Farahani, J.; J. Schibler; M., Bentolila, A. Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy: from Theory to Practice // Microscopy: Science, Technology, Applications and Education

[18] Princip rada STED mikroskopije, (22.5.2017.), http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/superresolution/stedconcept/indexflash.html

[19] Yajima et al. A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. // Nat Struct Mol Biol (2008), doi: 10.1038/nsmb.1491

[20] Unpublished model derived by Maja Novak from Pavin group.

[21] Landau and Lifshitz, Theory of Elasticity, Pergamon Press, 1959

[22] Nizette, M; Goriely A. Towards a classification of Euler-Kirchoff filaments. // J.Math.Phys., 2830-2880, 1999