



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Biološki odsjek

Snježana Kodba

Učestalost aneuploidije u tumorskim i netumorskim stanicama te određivanje osnovnih pogrešaka pri segregaciji kromosoma

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biofiziku stanice sa Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom prof. dr. sc. Ive Tolić te mentorstvom prof. dr. sc.

Vlatke Zoldoš sa Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

Popis oznaka, kratica i simbola:

APC/C – kompleks koji promovira anafazu (engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*)

CDK – kinaza ovisna o ciklinu (engl. *cyclin dependent kinase*)

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

CIN – kromosomska nestabilnost (engl. *chromosomal instability*)

d_KC – interkinetohorna udaljenost

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

FBS – serum za poticanje rasta stanica (engl. *fetal bovine serum*)

FISH – fluorescentna hibridizacija *in situ* (engl. *fluorescent in situ hybridization*)

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

MAP – protein vezan za mikrotubule (engl. *microtubule associated protein*)

PBS – pufer za ispiranje stanica (engl. *phosphate buffered saline*)

RPE1 – stanice epitela oka (engl. *retinal pigment epithelium 1*)

SCF – kompleks Skp, Cullin, F-box (engl. *Skp, Cullin, F-box containing complex*)

U2OS – stanice koštanog osteosarkoma

v_KC – brzina kretanja kinetohora

Sadržaj

1) Uvod.....	1
2) Literaturni pregled.....	2
2.1. Stanična dioba	2
2.1.1. Stanični ciklus	2
2.1.2. Kontrola stanične diobe	3
2.1.2.1. Kompleks ciklina G1 i kinaza ovisnih o ciklinu	4
2.1.2.2. Kompleks ciklina faze S i kinaza ovisnih o ciklinu	4
2.1.2.3. Kompleks mitotskih ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu	4
2.1.3. Vremenski tijek mitoze.....	4
2.2. Diobeno vreteno	6
2.3. Aneuploidija	10
2.3.1. Stanični mehanizmi nastanka aneuploidije i tumora	10
2.1.6. Nepravilna vezanja kinetohora na diobeno vreteno	11
2.3.2. Monotelichna orijentacija	12
2.3.3. Sintelična orijentacija	12
2.3.4. Merotelichna orijentacija	12
2.3.5. Kromosomski mostovi.....	13
2.4. Mitotska kontrolna točka.....	14
3) Materijali i metode	16
3.1. Stanična kultura.....	16
3.1.1. Uzgoj stanica	16
3.1.2. Priprema uzoraka za mikroskopiranje	17
3.2. Mikroskopiranje	17
3.3. Analiza snimaka	17
3.3.1. Određivanje vrste greške u staničnoj diobi	18
3.3.2. Mjerenje vremena potrebnog od trenutka pucanja jezgrine ovojnice do početka anafaze	19
3.3.3. Mjerenje interkinetohorne udaljenosti	20
3.3.3. Mjerenje kuta između pola diobenog vretena i para kinetohora.....	21
3.3.4. Mjerenje udaljenosti i brzine kretanja merotelichno vezanih kinetohora.....	22
3.3.5. Mjerenje širine merotelichno vezanih kinetohora	25
3.4. Izrada grafičkih prikaza	25
4) Rezultati	27
4.1. Učestalost grešaka u staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin veća je nego u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP	27
4.2.1. Trajanje mitoze je dulje u stanicama koje imaju nepotpunu kongresiju kromosoma u ekvatorijalnu ravninu.....	28

4.2.2. Trajanje mitoze u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP produljeno je ukoliko su bili prisutni monoorijentirani kromosomi.....	33
4.3.1. Interkinetohorna udaljenost monoorijentiranih kromosoma pokazuje velike varijacije te se naglo poveća nekoliko minuta prije anafaze.....	36
4.3.2. Interkinetohorna udaljenost kromosoma koji kasne s kongresijom u ekvatorijalnu ravninu varira do njihovog pozicioniranja u ekvatorijalnoj ravnini stanice	38
4.3.3. Interkinetohorna udaljenost kromosoma koji više puta migriraju s polova vretena u ekvatorijalnu ravninu i natrag na polove varira u skladu s monoorijentiranim kromosomima koji uzrokuju grešku.....	39
4.4.1. Kromosomi pogrešno segregiraju zbog monoteličnog vezanja.....	47
4.5.1. Merotelično vezane kinetohore stanične linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin se počinju gibati tek nekoliko minuta nakon početka anafaze uz veliki inicijalni pomak	50
4.5.2. Merotelično vezane kinetohore stanične linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP se počinju gibati tek nekoliko minuta nakon početka anafaze.	53
4.6. Merotelično vezane kinetohore stanične linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin šire su od amfitelično vezanih uslijed potezanja mikrotubula s oba pola diobenog vretena .	54
5) Rasprava.....	57
6) Zaključak.....	61
7) Literatura.....	62
Zahvale.....	65
Sažetak	66
Abstract	67
8) Životopis	68

1) Uvod

Stanična dioba je esencijalni događaj za eukariote kojim osiguravaju rast i razmnožavanje. Kako bi se organizam pravilno razvijao, dioba mora biti precizna i točna. Višak ili manjak genetičkog materijala može imati letalne posljedice za pojedinačne stanice ili organizam u cijelosti. Ispravnost diobe osigurava diobeno vreteno. Ukoliko svi kromosomi uspostave amfitelično vezanje na mikrotubule, neće doći do aneuploidije. Aneuploidija je stanje promijenjenog broja kromosoma od diploidnog, što je za ljude različito od $2n = 46$. Pojavom aneuploidije u germinativnim stanicama može doći do različitih poremećaja poput Downovog ili Turnerovog sindroma. Kada se aneuploidija dogodi u tjelesnim stanicama može pogodovati nastanku tumora, koji najčešće i jesu aneuploidni. Da stanice izbjegnu čestu aneuploidiju razvio se mehanizam mitotske kontrolne točke koji prepoznaje neispravna vezanja kromosoma na diobeno vreteno, te ukoliko ih ima, odgađa početak anafaze, odnosno segregaciju kromosoma.

Mitotska kontrolna točka nekad ipak napravi iznimku i ne spriječi neispravnu segregaciju kromosoma što rezultira aneuploidijom. Mehanizam nastanka aneuploidije još uvijek nije potpuno razjašnjen te nije poznato u kojim trenucima i zašto mitotska kontrolna točka zakaže i dozvoli da se kromosomi nepravilno segregiraju.

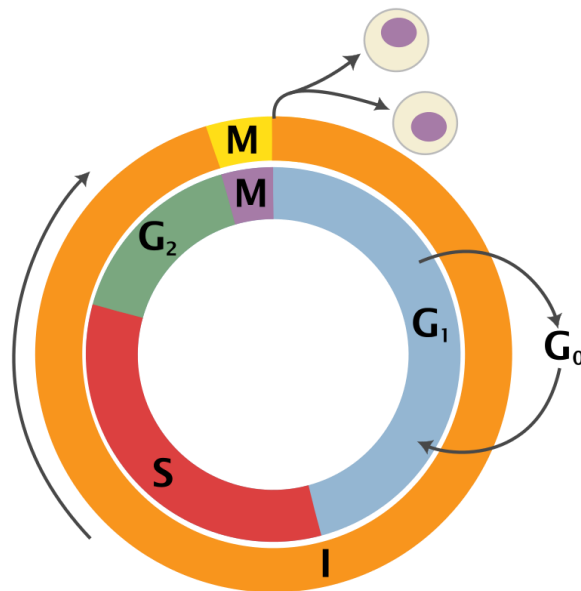
Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učestalost aneuploidije u tumorskoj staničnoj liniji U2OS i netumorskoj staničnoj liniji RPE1. Poseban naglasak stavljen je na pojavu i karakterizaciju monoorijentiranih kromosoma, događaja koji se rijetko spominje u literaturi kao izvor aneuploidije, pod pretpostavkom da će takve kromosome mitotska kontrolna točka uvijek prepoznati i spriječiti anafazu prije nego kromosomi poprave vezanje na diobeno vreteno. Proučavani su svi tipovi grešaka u stanicama te njihov odnos s mitotskom kontrolnom točkom.

2) Literaturni pregled

2.1. Stanična dioba

2.1.1. Stanični ciklus

Stanična dioba nužna je za život i razmnožavanje svakog eukariota. To je esencijalni mehanizam kojim nastaju nove stanice tako da se već postojeće stanice udvostruče i podijele. Glavni je cilj stanične diobe ispravno udvostručiti sav genetički materijal stanice te ga precizno podijeliti u dvije stanice kćeri, tako da svaka stanica dobije jednaku količinu genetičkog materijala. U eukariota stanični ciklus se dijeli u četiri faze: G1, S, G2 i M. Faze G1, S i G2 se zajedno nazivaju interfazom koja u ljudskim stanicama traje 23-24 h, dok je trajanje faze M, odnosno mitoze oko 1 h (slika 1). U fazi G1 staničnog ciklusa, stanice rastu te sintetiziraju molekule mRNA i proteine kao pripremu za nadolazeće korake mitoze. U fazi S koja traje 10 do 12 sati događa se replikacija genetičkog materijala. Nakon udvostručenja DNA, stanica ulazi u fazu vrlo brzog rasta te sinteze proteina, odnosno ulazi u fazu G2 staničnog ciklusa. Završetkom faze G2 počinje profaza koja označava ujedno i prvi stadij mitoze. Ukoliko se stanica ne dijeli kontinuirano, stanica iz faze G1 ulazi u mirujuću fazu G0 staničnog ciklusa (Alberts i sur., 2007).

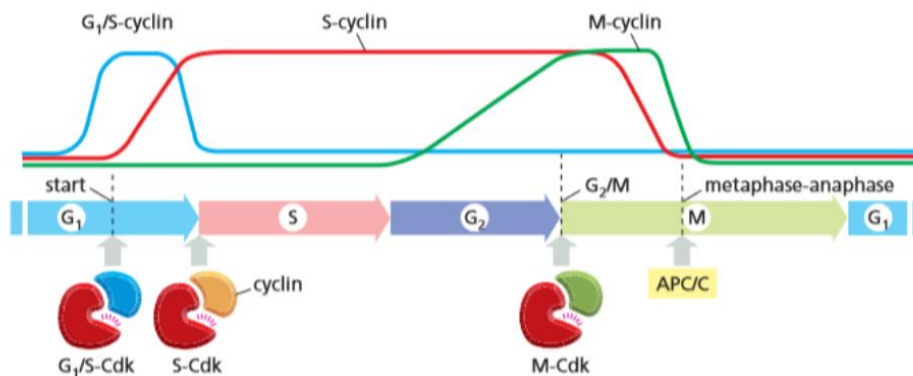


Slika 1. Ključne faze staničnog ciklusa. Stanični ciklus eukariotskih stanica dijeli se na 4 faze: *Gap* faze, G1 i G2 u kojima stanica raste i ubrzano sintetizira proteine; fazu sinteze DNA (S) te fazu M u kojoj se odvija dioba i citokineza. Faze G1, S i G2 zajedno čine interfazu. Ukoliko se ne dijeli kontinuirano, stanica ulazi u fazu G0 u kojoj miruje (preuzeto: Wheeler, 2006).

2.1.2. Kontrola stanične diobe

Stanični ciklus reguliran je različitim heterodimerima proteina kinaza. Koncentracija ciklina, regulatornih podjedinica heterodimera, povećava se i smanjuje ovisno o fazi staničnog ciklus u kojoj se stanica nalazi. Koncentracije katalitičkih podjedinica kinaza, tj. kinaza ovisnih o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDK) ne mijenjaju se toliko drastično tijekom staničnog ciklusa, no one nisu aktivne ukoliko nisu vezane s ciklinima. Kompleksi ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu aktiviraju ili inhibiraju stotine proteina na način da ih fosforiliraju u njihovim aktivnim mjestima. Stoga je ispravna aktivacija pojedinih kompleksa ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu nužna za progresiju stanica kroz stanični ciklus. Poznato je mnogo staničnih mehanizama kojim reguliraju aktivnost pojedinih heterodimera ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu (Lodish i sur., 2009).

Postoje tri vrste kompleksa ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu: kompleks ciklina G1 i kinaza ovisnih o ciklinu, kompleks ciklina faze S i kinaza ovisnih o ciklinu te kompleks mitotskih ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu (slika 2). U tranziciji kroz stanični ciklus važnu ulogu imaju i dvije ubikvitin ligaze: SCF i kompleks koji promovira anafazu (engl. *anaphase-promoting complex/cyclosome*, APC/C). Ubikvitin ligaze poliubikvitiniliraju svoje supstrate te ih tako označuju za proteosome. Oni ih prepoznaju i degradiraju (Lodish i sur., 2008).



Slika 2. Fluktuacije heterodimera ciklin-CDKs kroz stanični ciklus. Na početku staničnog ciklus aktivan je kompleks ciklina G1 i kinaza ovisnih o ciklinu. Za vrijeme replikacije DNA postaje aktivan kompleks ciklina faze S i kinaza ovisnih o ciklinu, dok je u mitozu aktivan kompleks mitotskih ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu. Tranziciju metafaze u anafazu pokreće kompleks APC/C (preuzeto: Alberts i sur., 2007).

2.1.2.1. Kompleks ciklina G1 i kinaza ovisnih o ciklinu

Ovi heterodimeri kontroliraju ulazak stanice u fazu S. Reguliraju transkripcijske faktore gena potrebnih za replikaciju kromosoma. Gene koji kodiraju enzime za deoksinukleozid trifosfate, DNA polimeraze i druge proteine bitne za replikaciju DNA, aktiviraju fosforilacijom njihovih transkripcijskih faktora. Ključna je i aktivacija kompleksa ciklina faze S i kinaza ovisnih o ciklinu (Lodish i sur., 2008).

2.1.2.2. Kompleks ciklina faze S i kinaza ovisnih o ciklinu

Kompleks ciklina faze S i kinaza ovisnih o ciklinu sintetizira se u kasnoj fazi G1 staničnog ciklusa. Međutim, odmah po sintezi na njih se vežu inhibitori koji im sprečavaju funkciju. Kada kompleks ciklina G1 i kinaza ovisnih o ciklinu postigne maksimalnu aktivnost, fosforilira inhibitore kompleksa ciklina S-faze i kinaza ovisnih o ciklinu. Na taj način omogućeno je da ih ubikvitin ligaza SCF veže i poliubikvitinilira. Degradacija inhibitora kompleksa ciklina faze S i kinaza ovisnih o ciklinu omogućuje njihovu aktivnost. Aktivni kompleks ciklina faze S i kinaza ovisnih o ciklinu fosforilira i aktivira proteinske komponente prereplikacijskog kompleksa. Naposljetku započinje replikacija DNA (Lodish i sur., 2008).

2.1.2.3. Kompleks mitotskih ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu

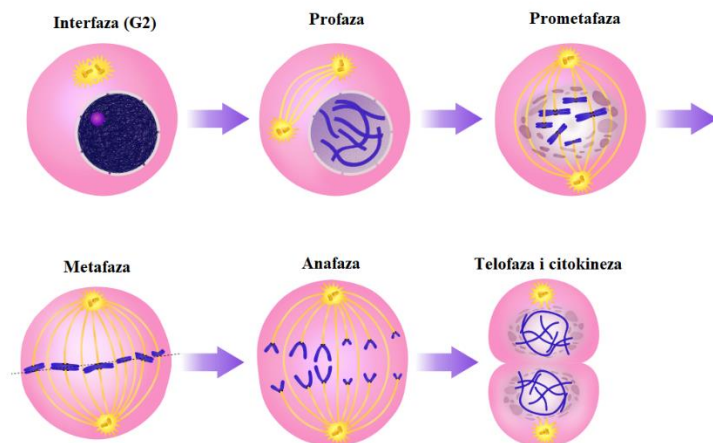
Tijekom faza S i G2 staničnog ciklusa sintetizira se kompleks mitotskih ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu. Međutim, njihova je aktivnost suprimirana fosforilacijom na inhibitornim mjestima. Kada se aktivira, kompleks mitotskih ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu fosforilira i aktivira stotine proteina, uključujući proteine vezane za kromatin koji promoviraju kondenzaciju kromosoma te proteine kinetohora koji uzrokuju sastavljanje kinetohora te njihovo vezanje na mikrotubule. Kada sve kinetohore uspostave ispravnu, amfiteličnu vezu s mikrotubulima te se pozicioniraju u ekvatorijalnu ravninu, kompleks APC/C poliubikvitinilira ključni regulatorni protein sekurin te tako vodi do njegove degradacije u proteasomima. Aktivan sekurin sprečava degradaciju kohezina, proteina koji drže sestrinske kromatide zajedno, povezujući ih u području centromera. Degradacija sekurina omogućuje sestrinskim kromatidama da se razdvoje što omogućava početak anafaze. Kompleks APC/C upravlja i degradacijom mitotskih ciklina u anafazi. Pad aktivnosti kompleksa mitotskih ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu omogućuje defosforilaciju njegovih ciljanih proteina što dovodi do početka telofaze, dekonenzacije kromosoma te na kraju citokineze (Lodish i sur., 2008).

2.1.3. Vremenski tijek mitoze

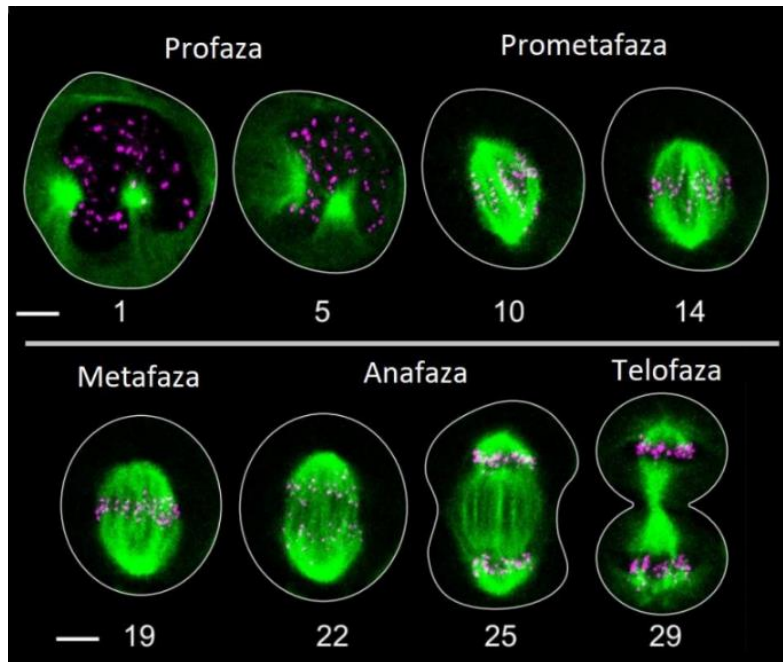
Vremenski tijek mitoze prikazan je na slici 3A. Tijekom interfaze, odnosno od kraja faze M jednog staničnog ciklusa do početka idućeg, vanjska jezgrina membrana se kontinuirano

nastavlja na endoplazmatski retikulum. Početkom mitoze, u profazi, sestrinske kromatide se počinju kondenzirati, a mikrotubuli počinju formirati diobeno vreteno izvan jezgre. Tijekom prometafaze dolazi do pucanja jezgrine ovojnice, a mikrotubuli s polova diobenog vretena rastu prema kromosomima te s njima ostvaruju veze. U metafazi se kromosomi smještaju u ekvatorijalnu ravninu stanice te se pripremaju za segregaciju. Za ispravno vezanje kromosoma, potrebno je da se svaka od sestrinskih kromatida veže mikrotubulima na suprotni pol diobenog vretena. Tada je uspostavljeno amfitelično vezanje kromosoma na diobeno vreteno. Tako vezani kromosomi se nakon nekog vremena slažu u ekvatorijalnoj ravnini stanice. Početkom anafaze razdvajaju se sestrinske kromatide. U anafazi A, mikrotubuli se skraćuju te povlače kinetohore prema polovima, dok se u anafazi B sestrinske kromatide dodatno odvajaju zbog produživanja diobenog vretena, odnosno udaljšavanja centrosoma. Kada završi razdvajanje kromosoma, u procesu telofaze, diobeno vreteno se disocira, kromosomi se dekondenziraju te se naposljetku jezgrina ovojnica ponovno stvara oko segregiranih kromosoma (slika 3). Formira se kontraktilni prsten od aktinskih i miozinskih filamenata koji se postupno sužava i fizički odvaja citoplazmu (citokineza) kako bi nastale dvije stanice kćeri (Cooper i sur. 2004).

A)



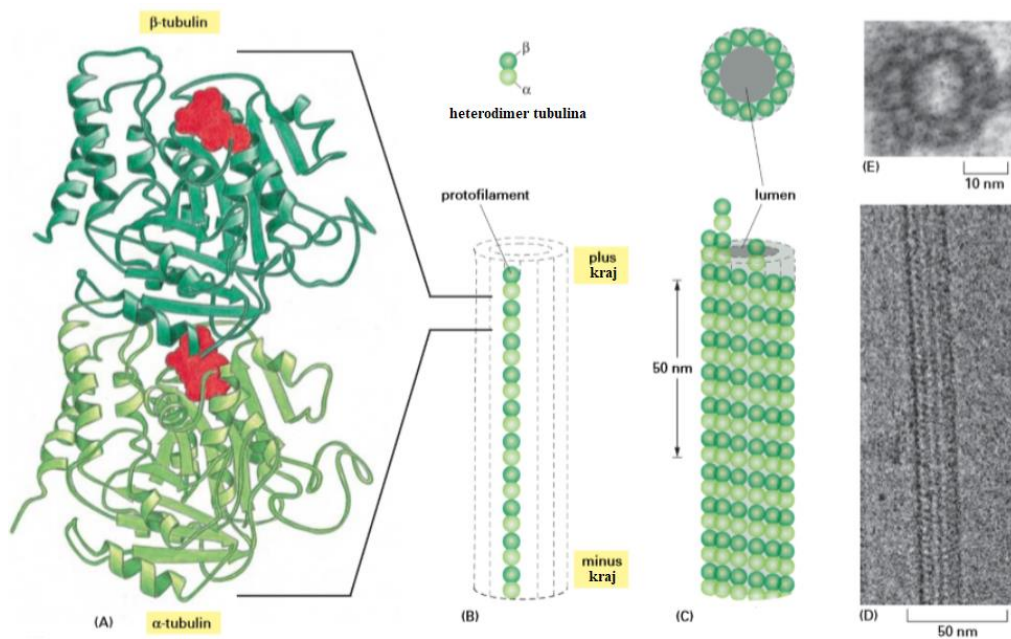
B)



Slika 3. Događaji u staničnoj diobi. A) Mitozi prethodi faza G2 interfaze. Mitoza je, radi lakšeg razumijevanja, podijeljena na 5 ključnih faza: profaza u kojoj se kromatin počinje kondenzirati, prometafaza u kojoj se kromosomi počinju vezati na mikrotubule diobenog vretena, metafaza u kojoj su kromosomi smješteni u ekvatorijalnu ravninu stanice, anafaza u kojoj dolazi do segregacije kromosoma, te telofaza u kojoj dolazi do odvajanja dviju stanica kćeri (preuzeto: Reece i sur., 2013). B) Mikroskopske snimke svih faza mitoze snimljene u staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin. Vrijeme je mjereno u minutama, a skala iznosi 5 μm (preuzeto: Tolić, 2018).

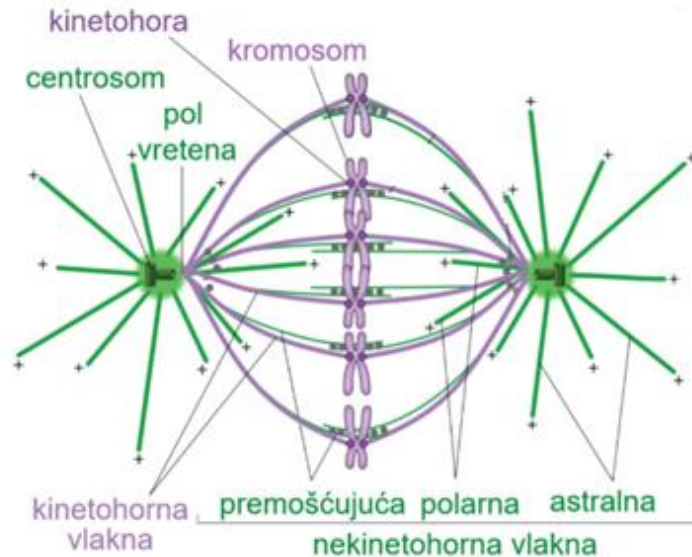
2.2. Diobeno vreteno

Mikrotubuli su građevne jedinice diobenog vretena. Oni su šuplji proteinski cilindri građeni od proteina tubulina, a organiziraju ih proteini asocirani s mikrotubulima (engl. *microtubule-associated proteins*, MAPs). Sastoje se od 13 protofilamenata koji su lateralno povezani i čine cilindar promjera 25 nm (slika 4). Nastaju polimerizacijom tubulina α i β pa je svaki protofilament građen od ponavljajućih podjedinica dimera $\alpha\beta$. Mikrotubuli imaju intrinzičnu polarnost: podjedinica α je izložena na kraju (-) mikrotubula, dok je podjedinica β izložena na kraju (+) mikrotubula (Alberts i sur., 2007).



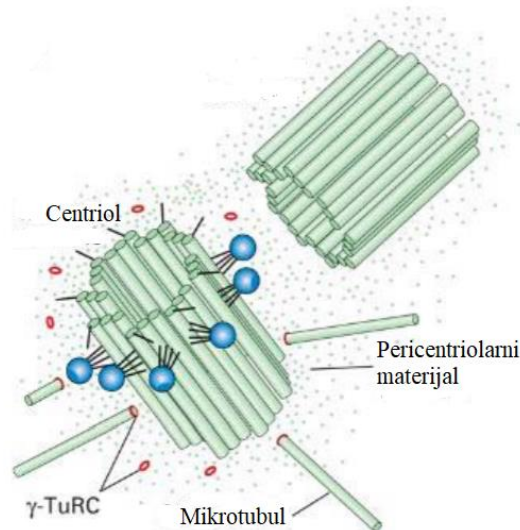
Slika 4. Struktura mikrotubula i tubulina. A) Strukturni prikaz globularnih proteina, heterodimera α i β tubulina. B) Polimerizacijom tubulina α i β nastaju čvrsto vezani protofilamenti koji imaju kraj (+) na kojem je izložen tubulin β i kraj (-) na kojem se nalazi tubulin α . C) Lateralnim povezivanjem 13 protofilamenata nastaje mikrotubul. D) Snimka mikrotubula upotrebom transmisijskog elektronskog mikroskopa. E) Snimka lumena mikrotubula okruženog s 13 protofilamenata upotrebom transmisijskog elektronskog mikroskopa (preuzeto: Alberts i sur., 2014).

Tradicionalno se mikrotubuli dijele na tri vrste: kinetohorni, interpolarni i astralni mikrotubuli (slika 5). Svežnjevi kinetohornih mikrotubula zovu se kinetohorna vlakna (k-vlakna) te čine grupu najstabilnijih mikrotubula u diobenom vretenu. Od izuzetne su važnosti jer se svojim krajem (+) vežu na kinetohore i osiguravaju segregaciju kromosoma u anafazi. Interpolarni mikrotubuli rastu sa suprotnih polova diobenog vretena, suprotnog su usmjerenja pa se regija u središtu diobenog vretena gdje se preklapaju naziva antiparalelnim preklopom. Astralni mikrotubuli rastu od polova diobenog vretena prema staničnoj membrani te uspostavljaju vezu sa staničnim korteksom. Nedavno je u animalnim stanicama pokazano postojanje i četvrte vrste mikrotubula nazvanih premošćujući mikrotubuli (engl. *bridging microtubules*). Mikroskopijom je pokazano da se oni nalaze blizu sestrinskih kinetohora te između njih tvore strukturu koja podsjeća na most (Kajtez i sur., 2016).



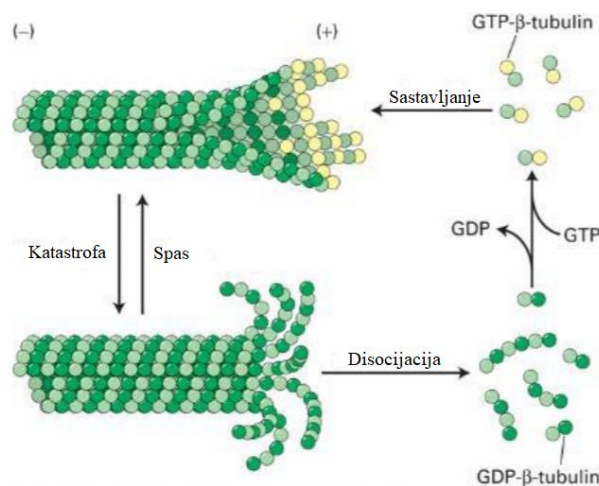
Slika 5. Shematski prikaz diobenog vretena i različitih vrsta mikrotubula. Kinetohorni mikrotubuli ostvaruju vezu centrosoma s kromosomima preko kinetohora. Premošćujući mikrotubuli čine preklop mikrotubula u blizini sestrinskih kinetohora, dok astralni mikrotubuli rastu u suprotnom smjeru, prema staničnoj membrani. Polarni mikrotubuli rastu od polova vretena prema ekvatorijalnoj ravnini. Oni zajedno čine nekinetohorne mikrotubule. (preuzeto: Tolić, 2018).

Nukleacija mikrotubula kreće iz središta organizacije mikrotubula (engl. *microtubule-organizing centers*, MTOCs). U animalnim stanicama takve centre nazivamo centrosomima. U njima ostaju usidreni krajevi (-) mikrotubula, dok krajevi (+) rastu prema periferiji (Pavin i Tolić, 2016). U interfazi po rastućim mikrotubulima hodaju motorni proteini koji organiziraju i prenose organele i druge strukture. Tijekom mitoze, stanice potpuno reorganiziraju mikrotubule kako bi formirali bipolarno diobeno vreteno. Ono nastaje iz dva centrosoma koji postaju polovi diobenog vretena. Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da se centrosomi sastoje od para ortogonalno raspoređenih cilindričnih centriola koji su okruženi amorfim pericentriolarnim materijalom (slika 6). Centrioli su visoko organizirane strukture koje se sastoje od devet tripleta mikrotubula. Nukleaciju mikrotubula započinju faktori u pericentriolarnom materijalu, a bitna komponenta za to je γ -tubulinski prstenasti kompleks (engl. *γ -tubulin ring complex*, γ -TuRC). γ -TuRC se sastoji od mnogo kopija posebnog oblika tubulina γ (Cooper i sur., 2004).



Slika 6. Građa centrosoma. Centrosomi su građeni od dva centriola. U pericentriolarnom materijalu nalazi se γ -TuRC iz kojeg kreće nukleacija mikrotubula (preuzeto: Lodish i sur., 2008).

Mikrotubuli su iznimno dinamične strukture. Na svojim se krajevima neprestano sastavljaju i rastavljaju. Prosječni je životni vijek mikrotubula manji od minute za stanice koje su u mitozu, te 5-10 minuta za interfazne stanice. Sastavljaju se polimerizacijom tubulinskog dimera $\alpha\beta$ u procesu kojeg kataliziraju proteini MAPs. Tubulin α i β vežu i molekulu GTP. Molekula GTP vezana na tubulin β može hidrolizirati nakon vezanja dimera na mikrotubule, dok onaj vezan na tubulin α nikad ne hidrolizira. Nakon hidrolize tubulina GTP- β u tubulin GDP- β , dimer ima manji afinitet za vezanje na mikrotubule te se javlja postupna depolimerizacija (slika 7). Hidroliza oblika GTP tubulina β u oblik GDP bitna je za dinamiku krajeva (+) mikrotubula koji se ovisno o tome produžuju ili skraćuju (Alberts i sur., 2014).



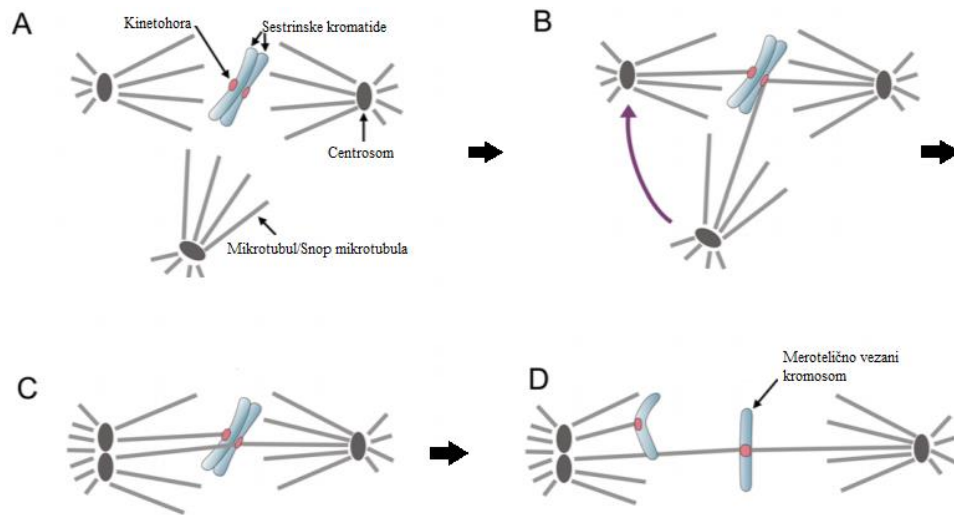
Slika 7. Dinamika mikrotubula. GTP- β -tubulin se veže kao dimer s tubulinom α na krajeve (+) mikrotubula i uzrokuje njihov rast. Hidrolizom nastaje GDP- β -tubulin koji zajedno s vezanim tubulinom α disocira s mikrotubula. Brza depolimerizacija mikrotubula uzrokuje katastrofu, dok spas nastaje brzom polimerizacijom (preuzeto: Lodish i sur., 2008).

2.3. Aneuploidija

Održavanje stalnog broja kromosoma je nužno za razvoj i preživljenje svakog organizma. Animalne stanice održavaju ispravan diploidni broj kromosoma tako što pri svakoj diobi precizno dijele kromosome na dva jednaka dijela. Greške u segregaciji kromosoma u mitozu rezultiraju nastankom aneuploidnih stanica kćeri. Ukoliko dođe do aneuploidije u stanicama zametka razvijaju se ozbiljne genetičke bolesti poput Downovog ili Turnerovog sindroma, a najčešće dolazi do pobačaja. Aneuploidija je također zajedničko obilježje tumorskih stanica, od kojih čak 70-95% pokazuje aneuploidni kariotip (Cimini, 2008). U tumorskim je stanicama često prisutna i kromosomska nestabilnost (engl. *chromosomal instability*, CIN), svojstvo karakterizirano velikom učestalošću pogrešne segregacije koja uzrokuje višak ili manjak kromosoma na kraju svake mitoze (Baker i Deursen, 2010). Do sad nije dobro poznato kolika je učestalost grešaka u mitozu u većini tkiva i organa, s iznimkom limfocita iz periferne krvi koji se često koriste u epidemiološkim istraživanjima. Tehnikom fluorescencijske hibridizacije *in situ* (engl. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) upotrebom sonda specifičnih za pojedino centromerno područje kromosoma čovjeka pokazano je da učestalost grešaka za svaki pojedini kromosom varira od 0,03% do 10% (Cimini, 2008). Međutim, pojavom novih preciznijih tehnika poput sekvenciranja pojedinačnih stanica broj grešaka pokazao se manjim (Knouse i sur., 2014). Također, broj grešaka se pokazao manjim u tkivima i organoidima (Knouse i sur., 2018).

2.3.1. Stanični mehanizmi nastanka aneuploidije i tumora

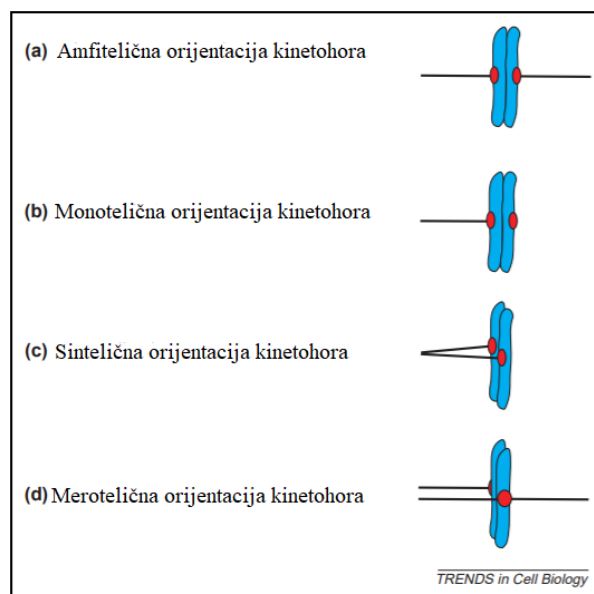
Dvije su glavne hipoteze kako aneuploidija može dovesti do nastanka tumora. Prema jednoj, prvi korak do aneuploidije je tetraploidizacija koja nastaje zbog greške u citokinezi. Tetraploidine stanice prolaze više multipolarnih dioba koje uzrokuju mnogo pogrešno segregiranih kromosoma i naposljetku razvoj aneuploidnih i heterogenih kariotipa, karakterističnih za tumore (slika 8). Prema drugoj hipotezi aneuploidija nastaje gubitkom jednog ili više kromosoma što može dovesti do daljnje kromosomske nestabilnosti i transformacije (Cimini i Degrossi, 2005).



Slika 8. Nastanak aneuploidije kao posljedica tetraploidizacije. Kao posljedica nastanka tetraploidnih stanica diobeno vreteno postaje multipolarno. Multipolarna vretena imaju više od dva centrosoma te ih karakterizira veća stopa merotelično orijentiranih kromosoma (preuzeto: Cimini i Degrassi, 2005).

2.1.6. Nepravilna vezanja kinetohora na diobeno vreteno

Kako bi se kromosomi u anafazi ispravno podijelili sestrinske kinetohore moraju stupiti u interakciju s mikrotubulima s različitih polova stanica. Međutim, mikrotubuli se mogu pogrešno vezati što dovodi do monoteličnih, sinteličnih te meroteličnih vezanja (slika 9) (Cimini i Degrassi, 2005).



Slika 9. Različiti načini vezanja kinetohora na mikrotubule diobenog vretena. A) Tijekom prometafaze i metafaze kromosomi trebaju uspostaviti amfiteličnu orijentaciju kinetohora,

odnosno sestrinske kinetohore se moraju vezati na mikrotubule koji dolaze sa suprotnih polova diobenog vretena. B) Međutim, često tome prethodi monotelična orijentacija kinetohora u kojoj je samo jedna od sestrinskih kinetohora vezana na jedan pol. C) Pogrešnim vezanjem kinetohora smatra se sintelična orijentacija kada se obje sestrinske kinetohore vežu na mikrotubule jednog pola diobenog vretena. D) Merotelična orijentacija kinetohora podrazumijeva da je jedna kinetohora mikrotubulima vezana na oba pola diobenog vretena (preuzeto: Cimini i Degrassi, 2005).

2.3.2. Monotelična orijentacija

Monotelično vezanje kinetohora podrazumijeva da je jedna sestrinska kinetohora vezana mikrotubulima na jedan pol diobenog vretena, dok druga ostaje nevezana. Takva vrsta vezanja je prisutna u svim stanicama barem neko vrijeme u početku profaze, dok se ne uspostavi ispravno amfitelično vezanje. Monotelična orijentacija rezultira pozicioniranjem kromosoma blizu polova za koji su vezani, a ukoliko se prije početka anafaze kinetohore ne pozicioniraju u ekvatorijalnu ravninu stanice, stanice kćeri će biti aneuploidne (jedna stanica kćer ima trisomiju, a druga monosomiju). Međutim, mitotska kontrolna točka prepoznaje monoteličnu orijentaciju za vrijeme diobe te odgađa početak anafaze dok se sva vezanja kinetohora ne isprave (Cimini i Degrassi, 2005).

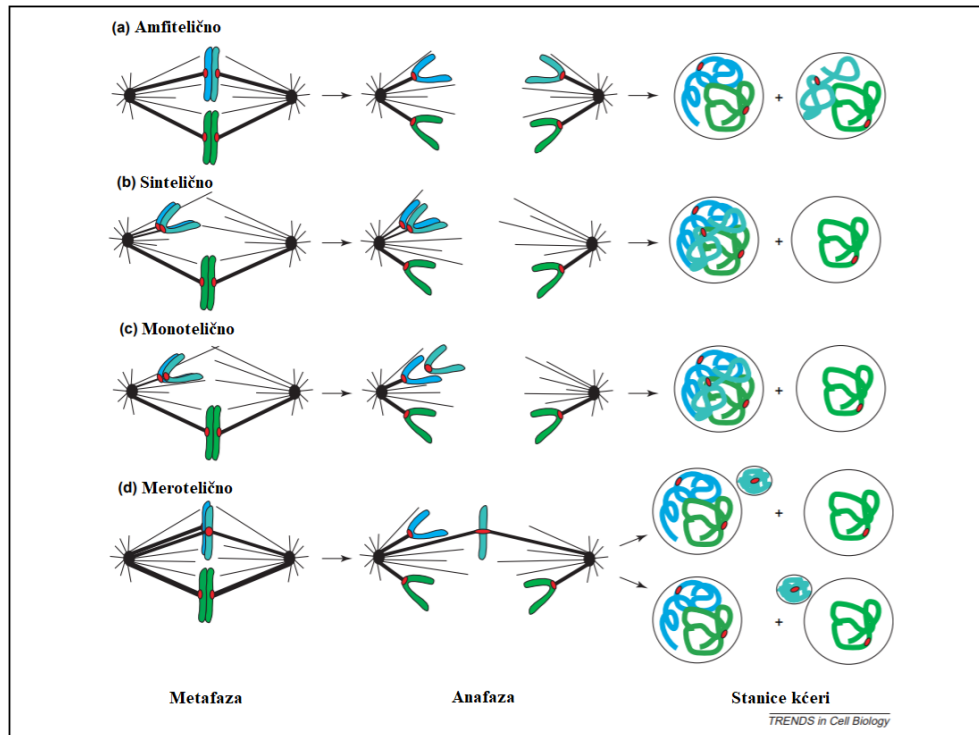
2.3.3. Sintelična orijentacija

Sintelično vezanje kinetohora se događa kad se obje sestrinske kinetohore vežu na mikrotubule koji dolaze s istog pola diobenog vretena (slika 10). Kao i monotelično vezane kinetohore, i sintelično vezane se pozicioniraju u blizini pola na kojeg su vezane mikrotubulima. Početak anafaze s prisutnim sintelično orijentiranim kinetohorama također bi rezultirao nastankom trisomične i monosomične stanice kćeri. Taj događaj odgađa mitotska kontrolna točka što omogućava stanici da ispravi pogrešno vezanje kromosoma (Cimini i Degrassi, 2005).

2.3.4. Merotelična orijentacija

Merotelično vezanje kinetohora se događa kad se jedna kinetohora veže na mikrotubule koji dolaze s oba pola diobenog vretena (slika 10). Kromosomi s jednom ili obje merotelično vezane kinetohore pozicioniraju se u ekvatorijalnu ravninu stanice, a ne blizu polova diobenog vretena. Takav tip vezanja kinetohora ne prepoznaje mitotska kontrolna točka pa anafaza u tim stanicama nije odgođena. Kad stanica uđe u anafazu, sudbinu kinetohore, odnosno kromatide određuje veličina snopova mikrotubula koji su vezani s pojedinog pola. Ako je jedan od dva snopa značajno deblji od drugoga, kinetohora će tijekom anafaze migrirati prema polu diobenog

vretena s kojeg dolazi taj snop mikrotubula. Takav način vezanja također može dovesti do pogrešne segregacije i aneuploidije (Compton, 2011).



Slika 10. Pozicioniranje kromosoma u metafazi i anafazi. A) Amfitelično orijentirani kromosomi smještaju se u ekvatorijalnu ravninu tijekom metafaze. U anafazi dolazi do ispravne diobe genetičkog materijala pa stanice kćeri dobivaju jednaku količinu DNA. B) Sintelično orijentirani kromosomi prepoznaju se po pozicioniranju blizu pola tijekom metafaze. U anafazi obje sestrinske kromatide odlaze u jednu stanicu kćer te stoga dolazi do pogrešne segregacije DNA u stanice kćeri. C) Monotelično orijentirani kromosomi se nalaze blizu pola tijekom metafaze. U anafazi rezultiraju odvajanjem obiju sestrinskih kromatida u jednu stanicu kćer. D) Merotelično orijentirani kromosomi ispravno su pozicionirani tijekom metafaze, ali u anafazi zaostaju u ekvatorijalnoj ravnini što može uzrokovati pogrešnu segregaciju (preuzeto: Cimini i Degrossi, 2005).

2.3.5. Kromosomski mostovi

Kromosomski mostovi se mogu identificirati u stanicama u anafazi ili telofazi kao DNA koja se proteže između segregirajućih kromosoma. U stanicama se može uočiti kako se proteže između dviju kinetohora koje leže u istoj ravnini ili kao golu DNA koja nije omeđena kinetohorama. U nekim slučajevima kromosomski mostovi pucaju tijekom anafaze pa se ne vidi kontinuirani lanac DNA, već dva dijela DNA koja se protežu od kinetohora prema središtu ekvatorijalne ravnine. Kromosomski mostovi se mogu javiti kao posljedica disfunkcije

topoizomeraze II, poremećaja u degradaciji kohezina, perturbacija u funkciji kohezina ili oštećenja DNA (Pampalona i sur., 2016).

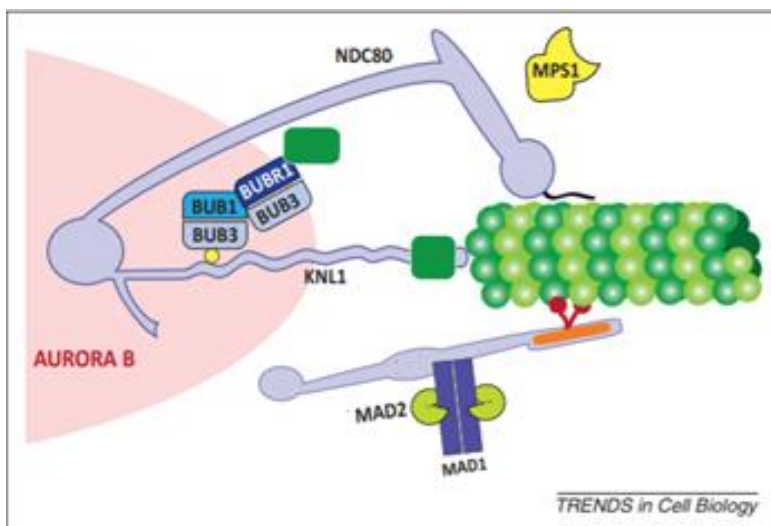
2.4. Mitotska kontrolna točka

Ispravna stanična dioba je ključan proces za održavanje života svih organizama. U jednostaničnih organizama mora postojati ravnoteža između staničnog rasta i stanične diobe kako bi se veličina stanice održavala konstantnom. Višestanični organizmi moraju precizno kontrolirati staničnu diobu kako bi se svi organi i tkiva normalno razvijali (Alberts i sur., 2014).

Segregacija kromosoma bez greške ovisi o stabilnom vezanju mikrotubula na kinetohore. Mitotska kontrolna točka nadzire takva vezanja te ukoliko ne dođe do ispravnog vezanja anafaza se odgađa. Ako u stanici postoji monotelično ili sintelično vezanje, mitotska kontrolna točka će dati znak za zaustavljanje anafaze. Mreža proteina na kinetohorama koja je zadužena za vezanje mikrotubula je integrirana s najbitnijim komponentama signaliziranja u mitotskoj kontrolnoj točki. Neispravno vezanje mikrotubula na kinetohore ispravlja sustav za popravak grešaka kojim upravlja kinaza Aurora B. Ova kinaza fosforilira proteine vanjske kinetohore koji vežu mikrotubule što uzrokuje promjene u dinamici mikrotubula i smanjuje afinitet kinetohora za mikrotubule. Iz tog razloga se tijekom mitoze veze između mikrotubula i kinetohora često stvaraju i uništavaju dok u konačnici svi kromosomi nisu biorijentirani i sva vezanja nisu stabilizirana. Ukoliko nema stabilnog vezanja i biorijentacije, mitotska kontrolna točka spriječit će stanice da uđu u anafazu (Amon, 1999).

Znak za početak anafaze daje E3 ubikvitin ligaza APC/C koja označuje inhibitore izlaska iz mitoze (ciklin B), te razdvajanja sestrinskih kromatida (sekurin) za proteosomalnu razgradnju. Zadatak mitotske kontrolne točke je inhibirati kompleks APC/C dok u stanici postoji nepravilno vezanih kinetohora. To radi na način da se kompleks proteina uključenih u mitotsku kontrolnu točku sastavlja na kinetohorama koje nisu vezane na mikrotubule diobenog vretena (Vluegel i sur., 2012).

Signal mitotske kontrolne točke stvara se na mreži KMN koju čine manji kompleksi proteina: KNL1-C, MIS12-C, NDC80-C. Ona čini vanjski dio kinetohore zadužen za interakcije s mikrotubulima te je stoga glavna meta mitotske kontrolne točke. Sastavljanje kompleksa mitotske kontrolne točke vodi kinaza MPS1 koja se povezuje s kompleksom NDC-80 (slika 11). Nakon njihove interakcije, započinje regrutacija ostalih proteina mitotske kontrolne točke: BUB1, BUB3, MAD1, MAD2 i Mad3/BUBR1 (Sacristian i Kops, 2014).



Slika 11. Članovi mitotske kontrolne točke. Mitotska kontrolna točka provjerava jesu li svi kromosomi ispravno vezani na mikrotubule. Svim komponentama uspravlja protein Aurora A, a komponente su: BUB1, BUB3, MAD1, MAD2, BUBR1 i MPS1. Te komponente sastavljaju se na dijelovima vanjske kinetohore, odnosno kompleksima NDC80 i KNL1 (preuzeto: Sacristian i Kops, 2014).

Dugo se nije znao odgovor na bitna pitanja u području diobenog vretena – što prepoznaje mitotska kontrolna točka te što je znak za odgodu anafaze. Još uvijek nije potpuno jasno odgađa li početak anafaze samo nevezana kinetohora ili je za početak diobe bitno i uspostaviti ispravnu tenziju (Pinsky i Biggins, 2005). Prema posljednjim istraživanjima, vezanje mikrotubula na kinetohore je dovoljno za utišavanje mitotske kontrolne točke. Međutim, još je nejasno koliko mikrotubula se treba vezati na kinetohoru da bi se vezanje smatralo ispravnim, odnosno amfiteličnim (Kuhn i Dumont, 2018; Etemad i sur., 2018).

3) Materijali i metode

3.1. Stanična kultura

3.1.1. Uzgoj stanica

Za provođenje eksperimenata korištene su ljudske stanične linije, netumorska imortalizirana stanična linija iz epitela oka RPE1 (engl. *retinal pigment epithelium 1*) sa stabilnom ekspresijom kinetohornog proteina CENP-A i Centrina1 koji lokalizira na centrosomima, obilježenih zelenim fluorescentnim proteinom GFP (engl. *green fluorescent protein*) i tumorska stanična linija koštanog osteosarkoma U2OS sa stabilnom ekspresijom kinetohornog proteina CENP-A obilježenog zelenim fluorescentnim proteinom GFP, tubulina obilježenog crvenim fluorescentnim proteinom i fotoaktivabilnog tubulina.

Stanice su uzgajane u mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Bazel, Švicarska) u koji je dodano 10% temperaturno inaktivirane otopine FBS (engl. *fetal bovine serum*) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 100 µg/mL penicilina (Biochrom AG, Berlin, Njemačka), 100 µg/mL streptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) te 50 µg/mL geneticina (Life Technologies, Waltham, MA, SAD) samo za staničnu liniju U2OS. Ovako pripremljen medij za uzgoj stanica prethodno je filtriran. Stanice su rasle na u inkubatoru Galaxy 170S (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 37 °C i 5% CO₂.

Uzgajane stanične kulture su presađivane svakih 48 ili 72 sata, odnosno u trenutku postignute konfluentnosti. Sa stanica je uklonjen medij te su isprane s 10 mL 1% otopine sterilnog pufera PBS (engl. *phosphate-buffered saline*). Zatim su stanice odvojene od podloge dodavanjem 1 mL 1%-tne otopine tripsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i inkubiranjem 5 min na 37 °C i 5% CO₂. Nakon odvajanja stanica od podloge, odlijepljene stanice se pomiješaju s 2 mL prethodno opisanog medija te se 500 µL homogene stanične suspenzije doda u novu posudu za uzgoj stanica u koju je prethodno dodano 10 mL svježeg hranjivog medija DMEM. Stanice se dalje uzgajaju u inkubatoru (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na temperaturi od 37 °C i u prisutnosti 5% CO₂.

Sastav PBS pufera (1%):

- 8,0 g/L NaCl
- 0,2 g/L KCl
- 1,42 g/L Na₂HPO₄
- 0,24 g/L KH₂PO₄

- pH 7,4

3.1.2. Priprema uzoraka za mikroskopiranje

Uzorci za mikroskop pripremaju se tijekom postupka presađivanja stanica. Nakon neutralizacije 1% otopine tripsina/EDTA miješanjem s 2 mL DMEM hranjivog medija, količina od 750000 stanica je nasađena u posudice za mikroskopiranje. U iste je posudice prethodno dodano 2 mL DMEM hranjivog medija. Korištene posudice za mikroskopiranje su plastične, s staklenim dijelom na dnu posudice promjera 35 mm i debljine 1,5 mm (MatTek Corporation, Ashland, SAD). Stanice se za mikroskopiranje nasađuju 24 sata prije samog mikroskopiranja te se održavaju u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i u prisutnosti 5% CO₂.

3.2. Mikroskopiranje

Stanice su snimane konfokalnim mikroskopom Bruker Opterra Multipoint Scanning (Bruker Nano Surfaces, Middleton, WI, SAD). Osnovna značajka laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa je točkasta izlazna apertura (engl. *pinhole*). Sustav je postavljen na Nikonov preokretni Ti-E mikroskop opremljen uljnim objektivom Nikon CFI Plan Apo VC x 100 / 1,4 (Nikon, Tokyo, Japan). Za vrijeme snimanja održavani su potrebni uvjeti od 37 °C i 5% CO₂ za stanice koje su uzgajane u inkubatoru Okolab Cage (Okolab, Pozzuoli, NA, Italija). Sve slike su snimljene Evolve 512 Delta EMCCD kamerom (Photometrics, Tucson, AZ, SAD). Sustav mikroskopa i sve postavke su kontrolirane softverom Prairie View Imaging Software (Bruker Nano Surfaces, Middleton, WI, SAD). Odabrane su pobudne laserske linije valnih duljina 488 nm za fluorescentni protein GFP te 561 nm za fluorescentni protein mCherry.

Laseri su postavljeni na jakost od 30%, a vrijeme izlaganja jedne ravnine iznosilo je 150 ms. Razmak između Z-ravnina snimanja bio je 1 µm, a za svaku stanicu snimljeno je 15 Z-ravnina. Stanice su snimane od trenutka pucanja jezgrine ovojnice do kraja anafaze s vremenskim razmakom od 1 min između svakog snimanja.

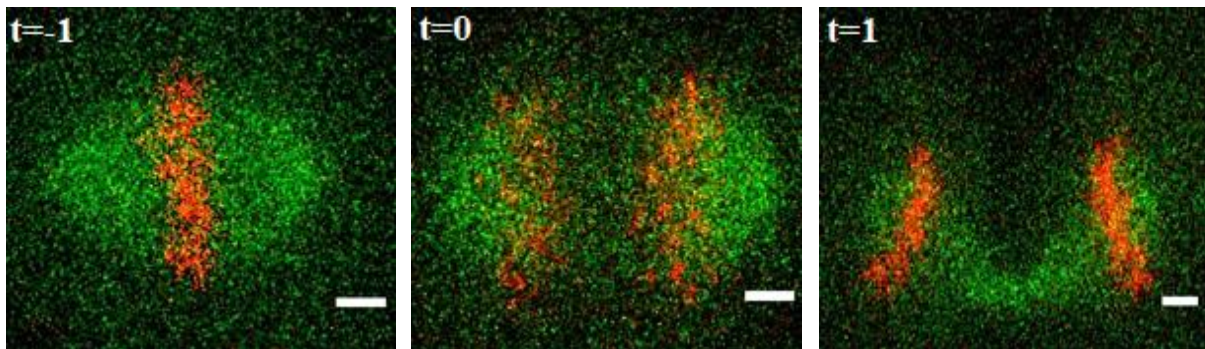
3.3. Analiza snimaka

Sve analize mikroskopskih snimaka napravljene su u programu ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, SAD). ImageJ je javno dostupan program specijaliziran za obradu snimki dobivenih mikroskopom. Temelji se na programskom jeziku Java (Oracle Corporation, Redwood, SAD). ImageJ sadrži alatnu traku te trake izbornika, pozicije i napretka. Alatna traka sadrži opcije za obrađivanje snimka s mikroskopa poput alata za promjenu boje na snimci te pomicanja i označavanja objekata na snimci.

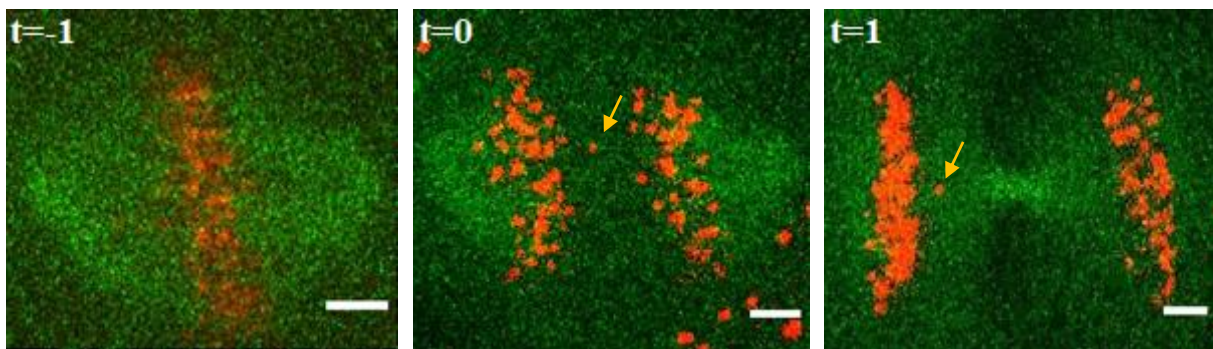
3.3.1. Određivanje vrste greške u staničnoj diobi

Stanice su promatrane od trenutka pucanja jezgrine ovojnice do kraja anafaze. Kada je nakon početka anafaze jedna kinetohora zaostajala u području ekvatorijalne ravnine, ta je greška klasificirana kao merotelija (slika 12B). Ako su zaostajale dvije kinetohore koje su bile u istoj ravnini, greška je označena kromosomskim mostom (slika 12C). Ukoliko je stanica u trenutku početka anafaze imala prisutne dvije kinetohore blizu polova, ta je greška klasificirana kao monoorijentirani par kinetohora (slika 12D). S obzirom da je razlučivost mikroskopa ograničena, nije bilo moguće utvrditi radi li se o monoteličnom ili sinteličnom tipu vezanja. U skladu s literaturom ti su parovi kinetohora nazvani monoorijentiranima (Cimini i Degrossi, 2005).

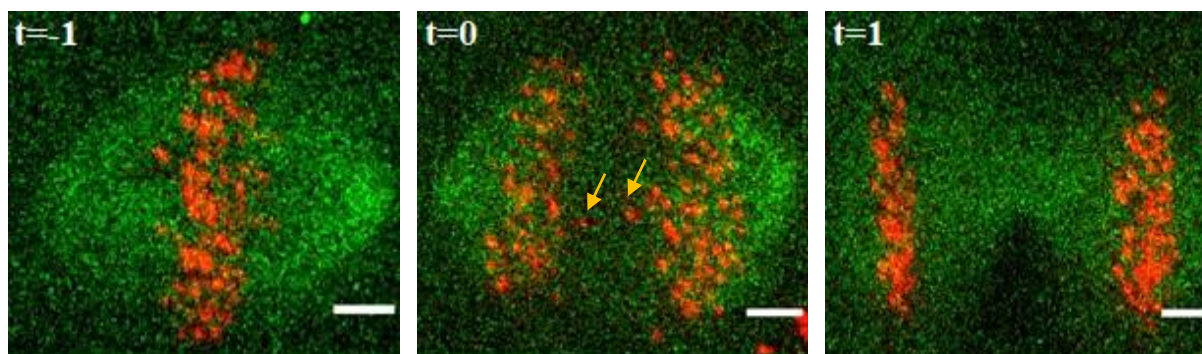
A)



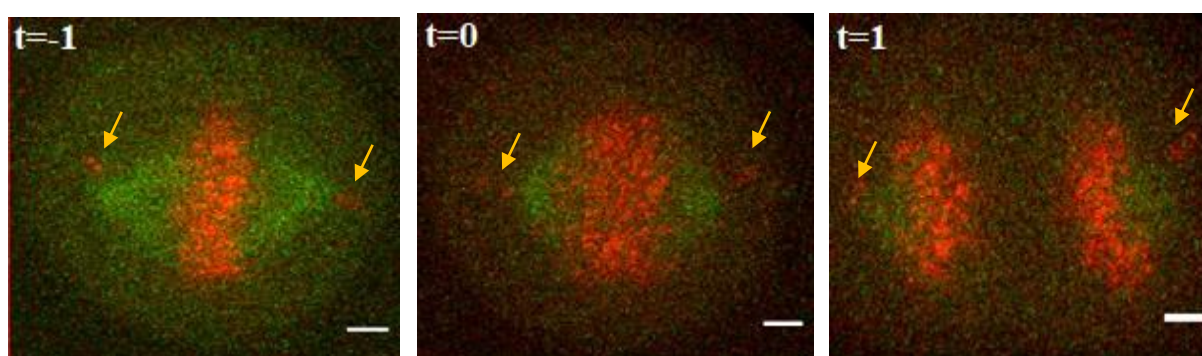
B)



C)

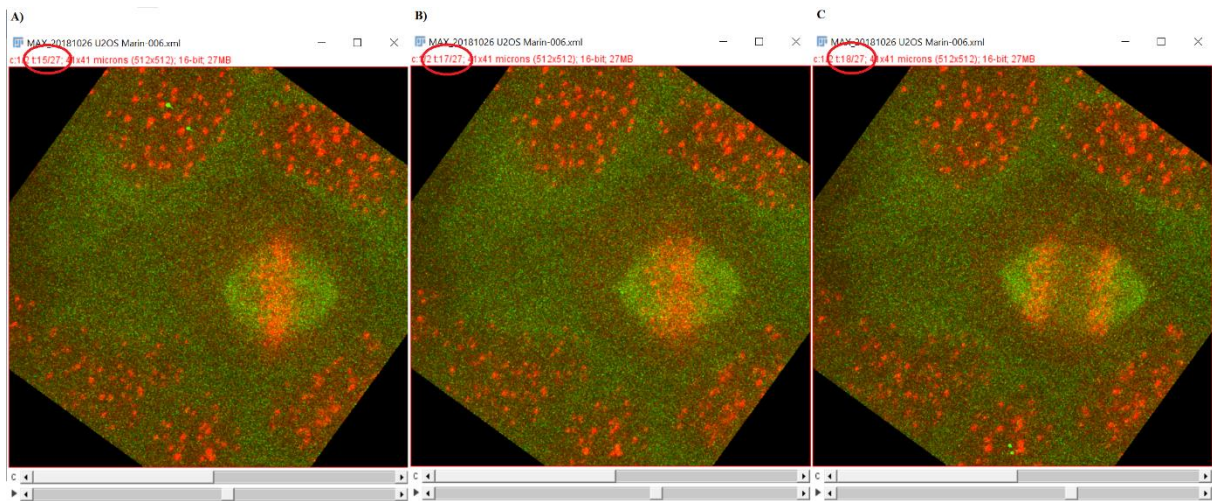


D)



Slika 12. Prepoznavanje različitih vrsta grešaka koje uzrokuju aneuploidiju. A) Amfitelično orijentirane kinetohore. B) Merotelično orijentirane kinetohore (žuta strelica). C) Kromosomski mostovi (žuta strelica). D) Monotelično orijentirane kinetohore (žuta strelica). Skala: 2 μ m.

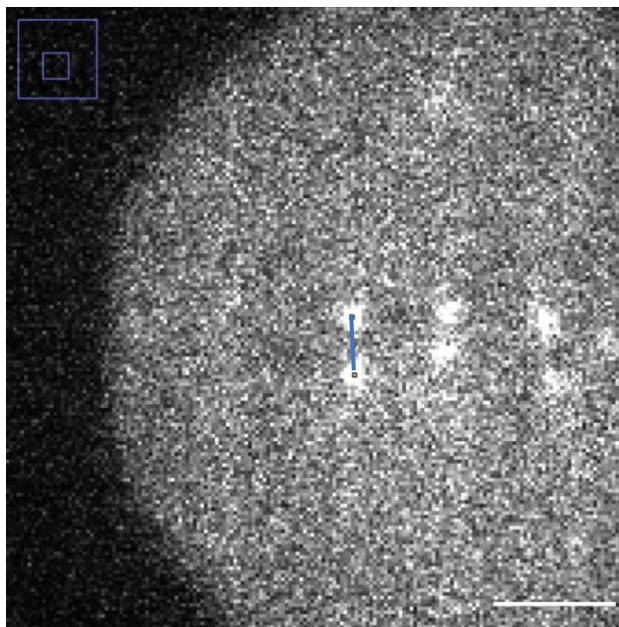
3.3.2. Mjerenje vremena potrebnog od trenutka pucanja jezgrine ovojnice do početka anafaze
Stanice su snimane u vremenskom razmaku od 1 minute. Početak snimanja je određen pucanjem jezgrine ovojnice, a kraj mjerenja bio je trenutak u kojem su se kinetohore počele odvajati prema suprotnim polovima diobenog vretena. Da bi se odredilo vrijeme koje je stanici bilo potrebno da od pucanja jezgrine ovojnice dođe do početka anafaze izbrojani su vremenski okviri između ta dva događaja. Broj vremenskih okvira umanjen za jedan jednak je vremenu u minutama koje je stanici potrebno da uđe u anafazu. Ovo umanjenje predstavlja korekciju na postavke programa koji nultu minutu označava kao prvu (slika 13).



Slika 13. Određivanje vremena potrebnog stanici za ulazak u anafazu. Prema vremenu t prikazanom u gornjoj traci u softveru ImageJ (crvena elipsa) određeno je vrijeme koje je stanici bilo potrebno da od pucanja jezgrine ovojnice dođe do anafaze. Stanici prikazanoj na slici za to je bilo potrebno 16 minuta ($t=17-1=16$).

3.3.3. Mjerenje interkinetohorne udaljenosti

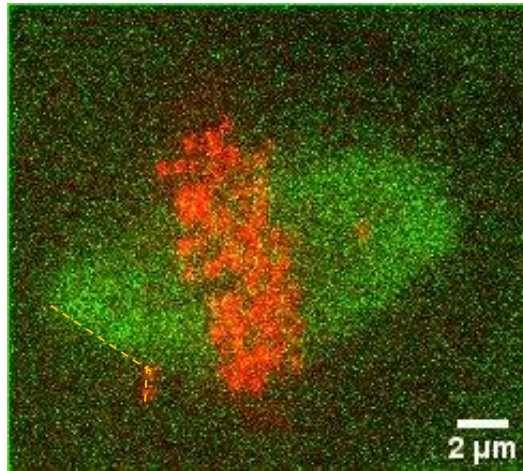
Za mjerenje interkinetohorne udaljenosti sve su stanice analizirane u jednoj Z-ravnini kako bi se osiguralo da udaljenost nije prividno manja ili veća. Alatom *Line* u programu ImageJ povučen je pravac od središta jedne kinetohore u paru do središta druge kinetohore. Alatom *Measure* izmjerena je udaljenost od jedne do druge kinetohore (slika 14).



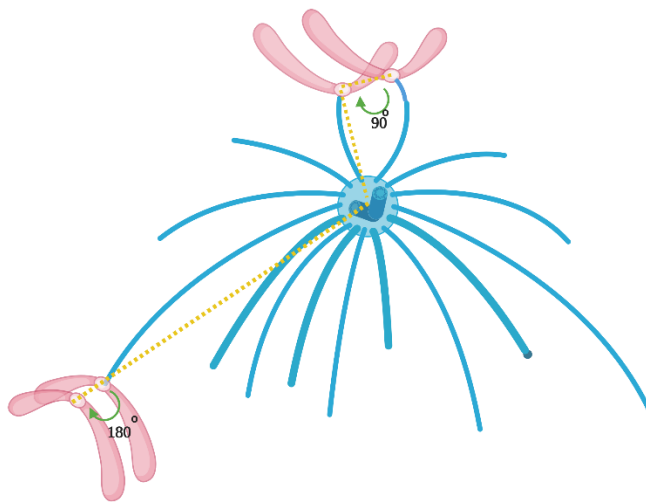
Slika 14. Mjerenje interkinetohorne udaljenosti. Alatom *Line* povučena je linija (plava linija) od središta jedne sestrinske kinetohore do središta druge sestrinske kinetohore. Alatom *Measure* izmjerena je vrijednost interkinetohorne udaljenosti. Za svaki vremenski okvir mjereno je na isti način. Skala: 1,5 μm .

3.3.3. Mjerenje kuta između pola diobenog vretena i para kinetohora

Kut između pola diobenog vretena i para kinetohora izmjeren je alatom *Angle*. Prvo je alatom *Line* povučena linija između pola diobenog vretena i kinetohore bliže polu diobenog vretena, a zatim druga linija od prve kinetohore do druge kinetohore koja je udaljenija od pola diobenog vretena (slika 15). Alatom *Angle* izmjeren je kut koji zatvaraju ta dva pravca. Očekivani kut za monotelično vezanje je $180 - 45^\circ$ te $0 + 45^\circ$, dok je očekivani kut za sintelično vezanje $90 \pm 45^\circ$ (slika 16).



Slika 15. Mjerenje kuta koji zatvara pol diobenog vretena i promatrani par kinetohora. Izmjeren je unutarnji kut kojeg zatvaraju linije spajajući pol diobenog vretena s jednom kinetohorom te tu kinetohoru s drugom kinetohorom (žute isprekidane linije).



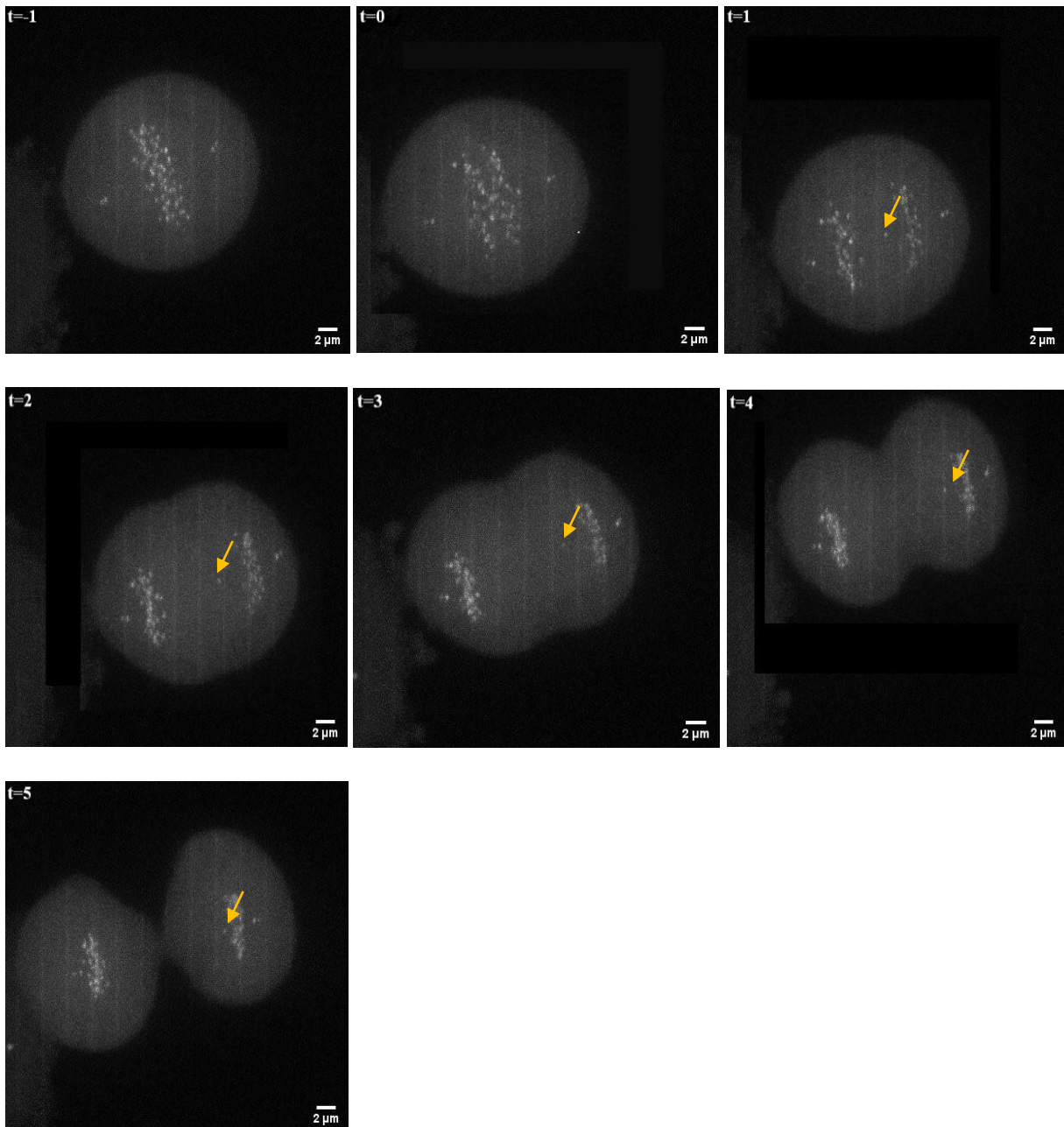
Slika 16. Određivanje tipa vezanja prema kutu između pola diobenog vretena i para kinetohora. Tip vezanja određen je kao monoteličan kada unutarnji kut koji spaja pol diobenog vretena s jednom kinetohorom te tu kinetohoru s drugom kinetohorom u paru (žute isprekidane linije) iznosi $180 - 45^\circ$ te $0 + 45^\circ$. Kada taj kut iznosi $90 \pm 45^\circ$ tip vezanja je sintelija (shema je napravljena u programu Biorender).

3.3.4. Mjerenje udaljenosti i brzine kretanja merotelično vezanih kinetohora

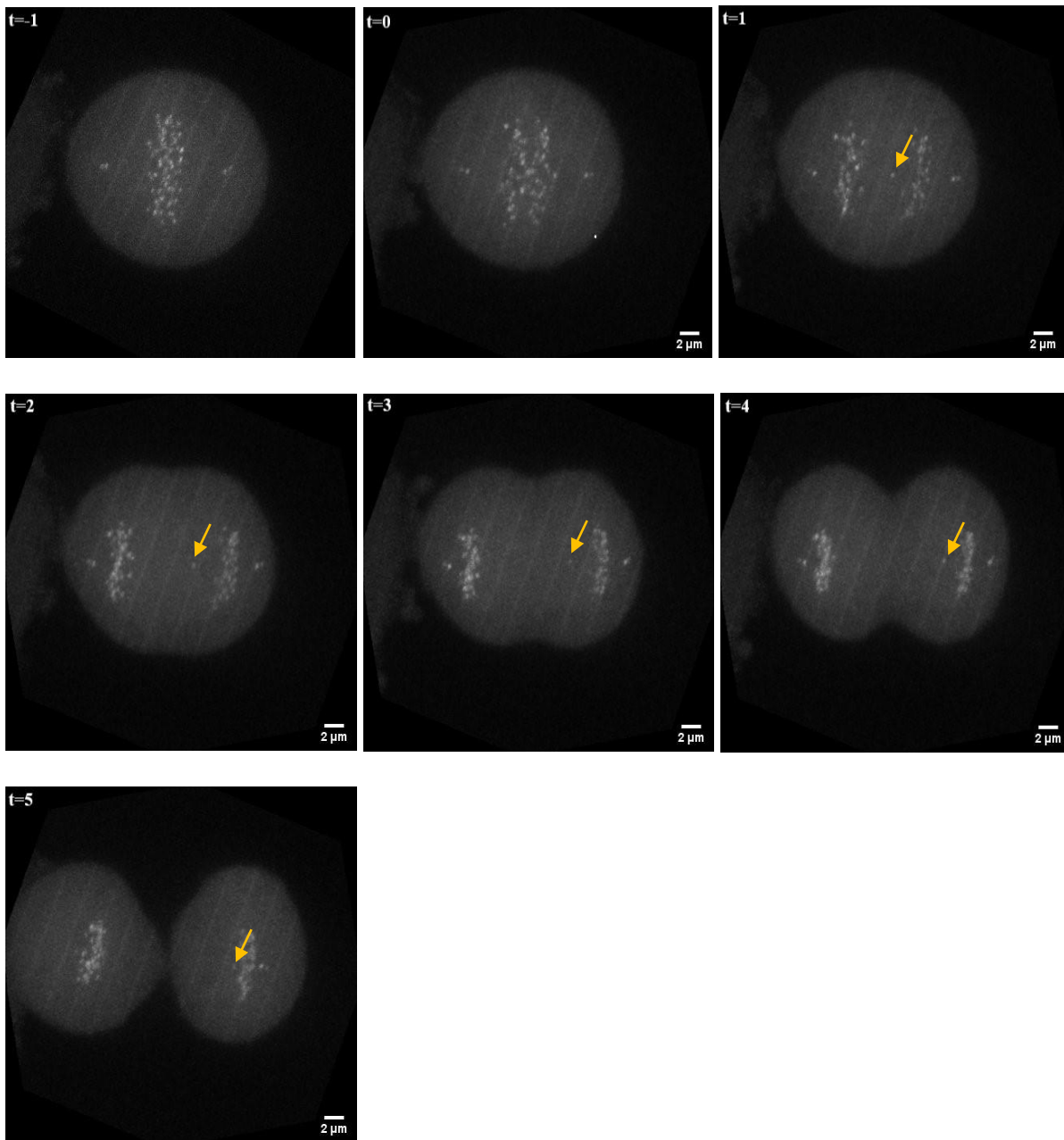
Za mjerenje udaljenosti i brzine kretanja merotelično vezanih kinetohora na stanice napravljena je korekcija na lateralni pomak alatom *Manual Drift Corection* (slika 17). Kao referentna pozicija za određivanje pomaka uzeta je ekvatorijalna ravnina stanice u prvom vremenskom okviru. Ekvatorijalna ravnina je označena alatom *Line* i u svakom drugom vremenskom okviru.

Softver je ekvatorijalnu ravninu potom pozicionirao na mjesto ekvatorijalne ravnine u prvom vremenskom okviru čime je korigirao kretanje stanice u XY koordinatama. Kretanje merotelično orijentiranih kinetohora praćeno je nakon početka anafaze. Kinetohora koja je zaostajala u ekvatorijalnoj ravnini označena je u svakom vremenskom okviru alatom *Tracing*, a alatom *ROI* prikazano je kretanje točaka u svakom vremenskom okviru. Alatom *Line* je povučena linija između pojedinačnih vremenskih okvira, a alatom *Measure* izmjerena je ta udaljenost (slika 18).

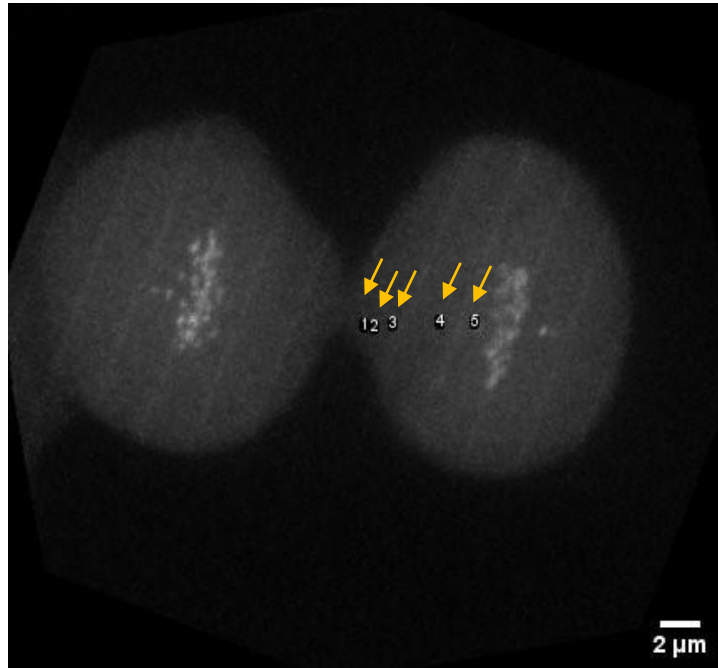
A)



B)



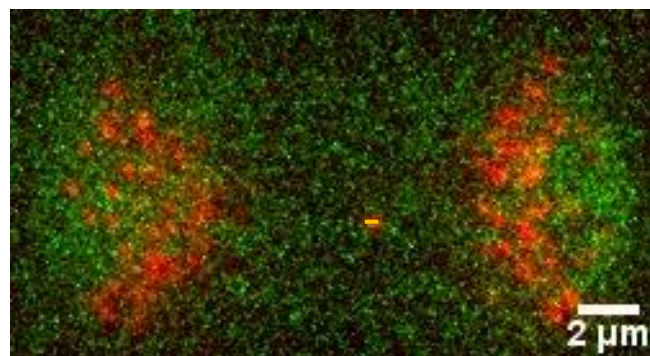
Slika 17. Kretanje merotelično vezanih kinetohora. A) Kretanje merotelično orijentiranih kinetohora (žuta strelica) bez korekcije na lateralni pomak. B) Kretanje merotelično orijentiranih kinetohora (žuta strelica) s korekcijom na lateralni pomak alatom *Manual Drift Corection*.



Slika 18. Mjerenje pomaka merotelično vezanih kinetohora. U svakom vremenskom okviru označena je pozicija merotelične kinetohore (1, 2, 3, 4, 5, 6 – žute strelice) te je na kraju između određenih pozicija izmjerena udaljenost koja je služila za izračun brzine gibanja. Skala: 2 μm .

3.3.5. Mjerenje širine merotelično vezanih kinetohora

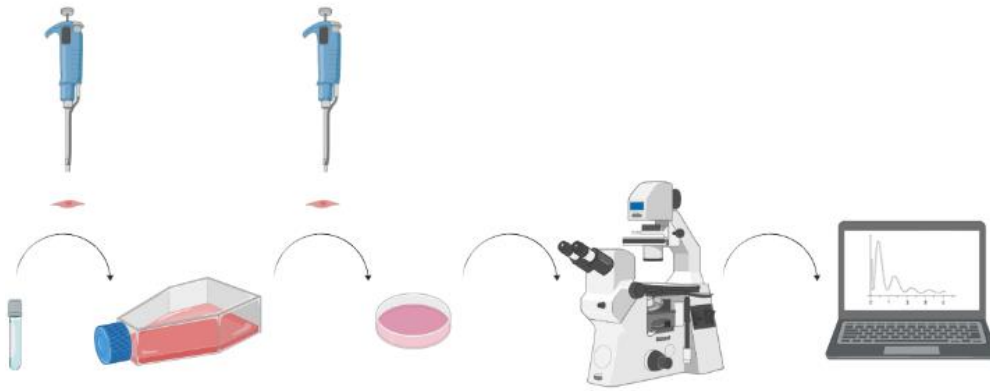
Alatom *Line* povučena je vodoravna linija od ruba do ruba kinetohore (slika 19), a alatom *Measure* izmjerena je širina merotelično vezanih kinetohora. Uspoređena je s na isti način izmjerenom širinom amfitelično vezanih kinetohora.



Slika 19. Mjerenje širine merotelično vezane kinetohore. Alatom *Line* (žuta linija) povučena je linija koja spaja vodoravne rubove kinetohore te je izmjerena njena duljina alatom *Measure*.

3.4. Izrada grafičkih prikaza

Svi dijagrami napravljeni su u softveru Biovinci (BioTuring, San Diego, CA, USA). Opis cijelog eksperimenta vidljiv je na slici 20.

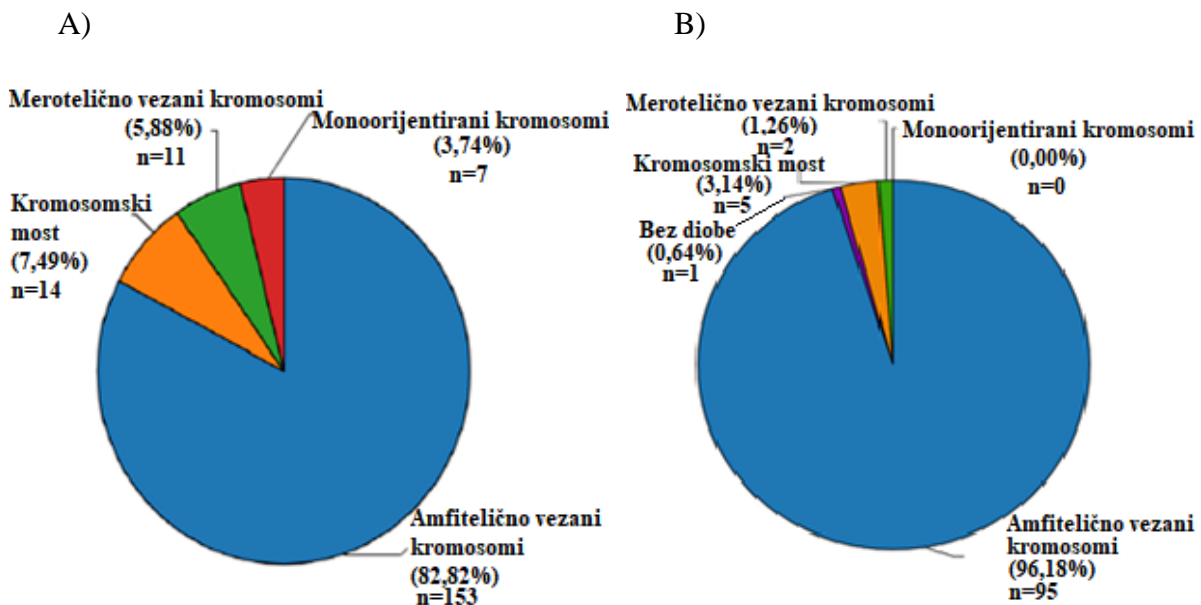


Slika 20. Grafički prikaz eksperimenta. Stanice su prvotno odležane te posađene u boce T75 za nasađivanje stanica. Da bi se pripremile za snimanje, stanice su premještene u posebne petrijeve zdjelice sa staklenim dnom. Jedan dan nakon nasađivanja stanice su snimane kamerom povezanom s fluorescencijskim mikroskopom. Dobivene snimke su potom analizirane (shema je napravljena u programu Biorender).

4) Rezultati

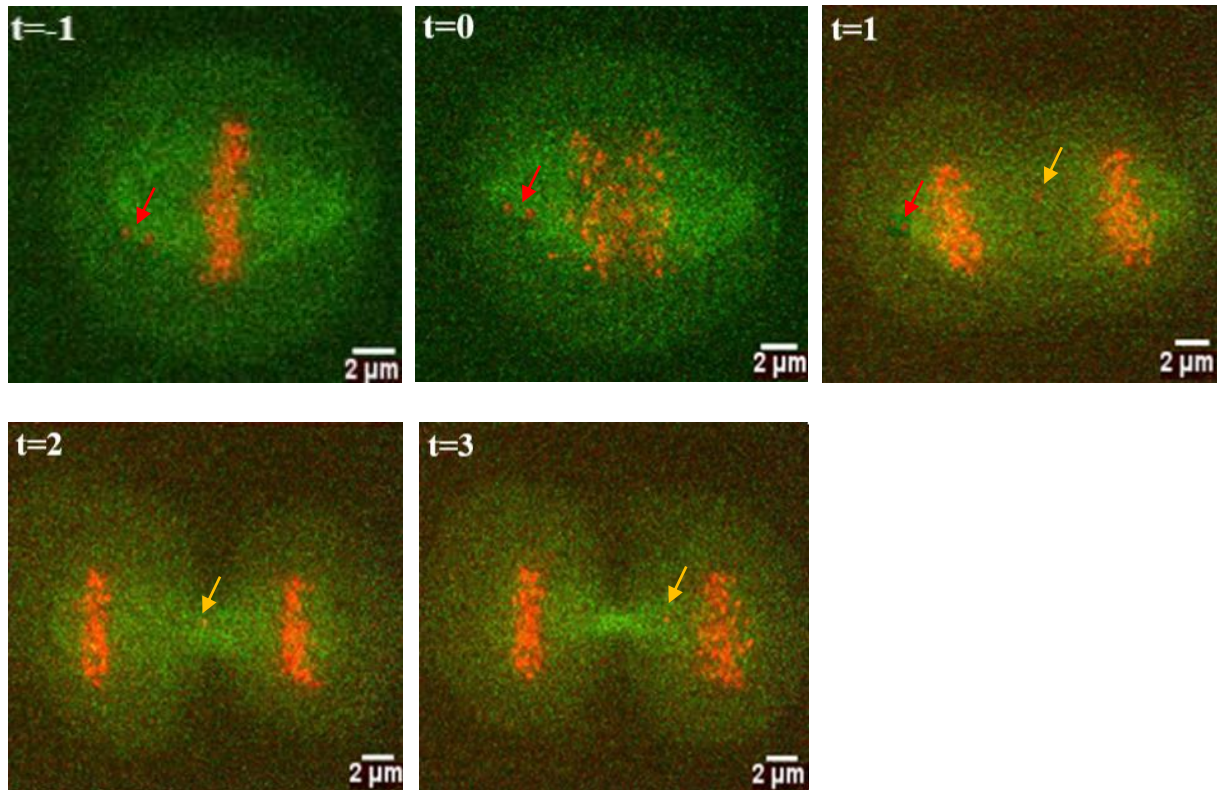
4.1. Učestalost grešaka u staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin veća je nego u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP

Kako bi se istražila učestalost pojedinih grešaka koje dovode do aneuploidije u različitim staničnim linijama, tumorske stanice linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin i netumorske stanice linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP snimane su od trenutka pucanja jezgrine ovojnice do kraja anafaze. Zabilježen je veći ukupni broj grešaka u tumorskoj staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin (slika 21) naspram netumorske stanične linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP (slika 21). U obje stanične linije najučestaliji tip greške je kromosomski most (slika 21). U nekim stanicama stanične linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin došlo je do anafaze bez kongresije svih kromosoma u ekvatorijalnu ravninu što se klasificira kao monoorijentirani par sestrinskih kromatida (slika 21). U staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin neke su stanice imale dva tipa grešaka u istoj staničnoj diobi (slika 22).



Slika 21. Učestalost pojedinih pogrešaka u stanicama. A) Učestalost pogrešnog vezanja kinetohora na mikrotubule u staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin. Od ukupno 187 snimljenih stanica najviše je bilo ispravnih dioba (plavo). Zabilježeni su kromosomski mostovi (narančasto), merotelično orijentirane kinetohore (zeleno) te monoorijentirane kinetohore (crveno). B) Učestalost pogrešnog vezanja kinetohora na mikrotubule u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP (ukupan broj stanica je 103). Najveći broj stanica imao je potpuno ispravnu staničnu diobu (plavo). Zabilježeni su

kromosomski mostovi (narančasto) i merotelično orijentirane kinetohore (zeleno). Jedna stanica se nije podijelila (ljubičasto).

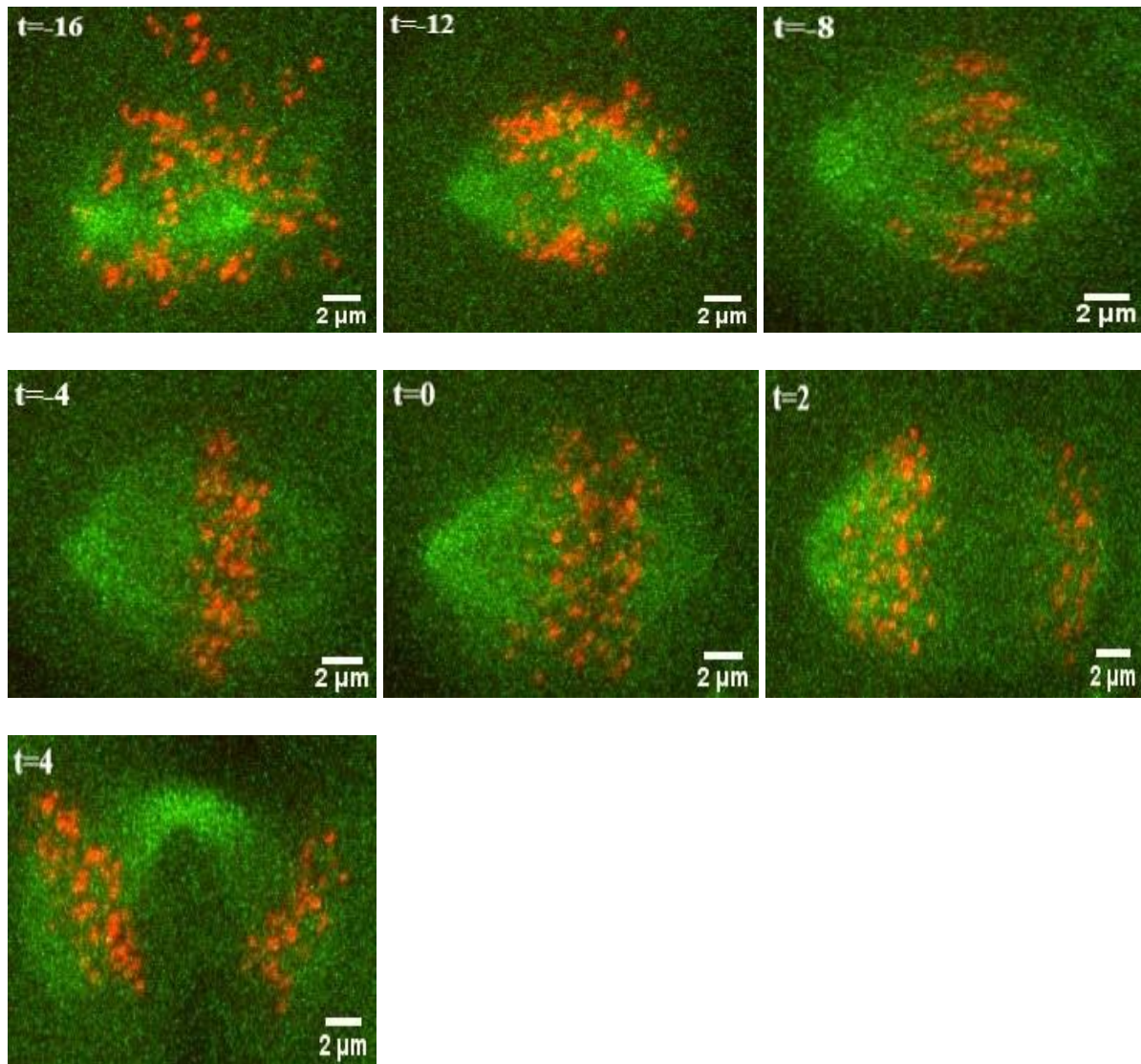


Slika 22. Kombinacija dviju grešaka u stanici U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin. U istoj stanici zabilježeno je merotelično vezanje kinetohora (žuta strelica) te mono-orijentirani par kinetohora (crvena strelica). Vrijeme (t) 0 označava početak anafaze.

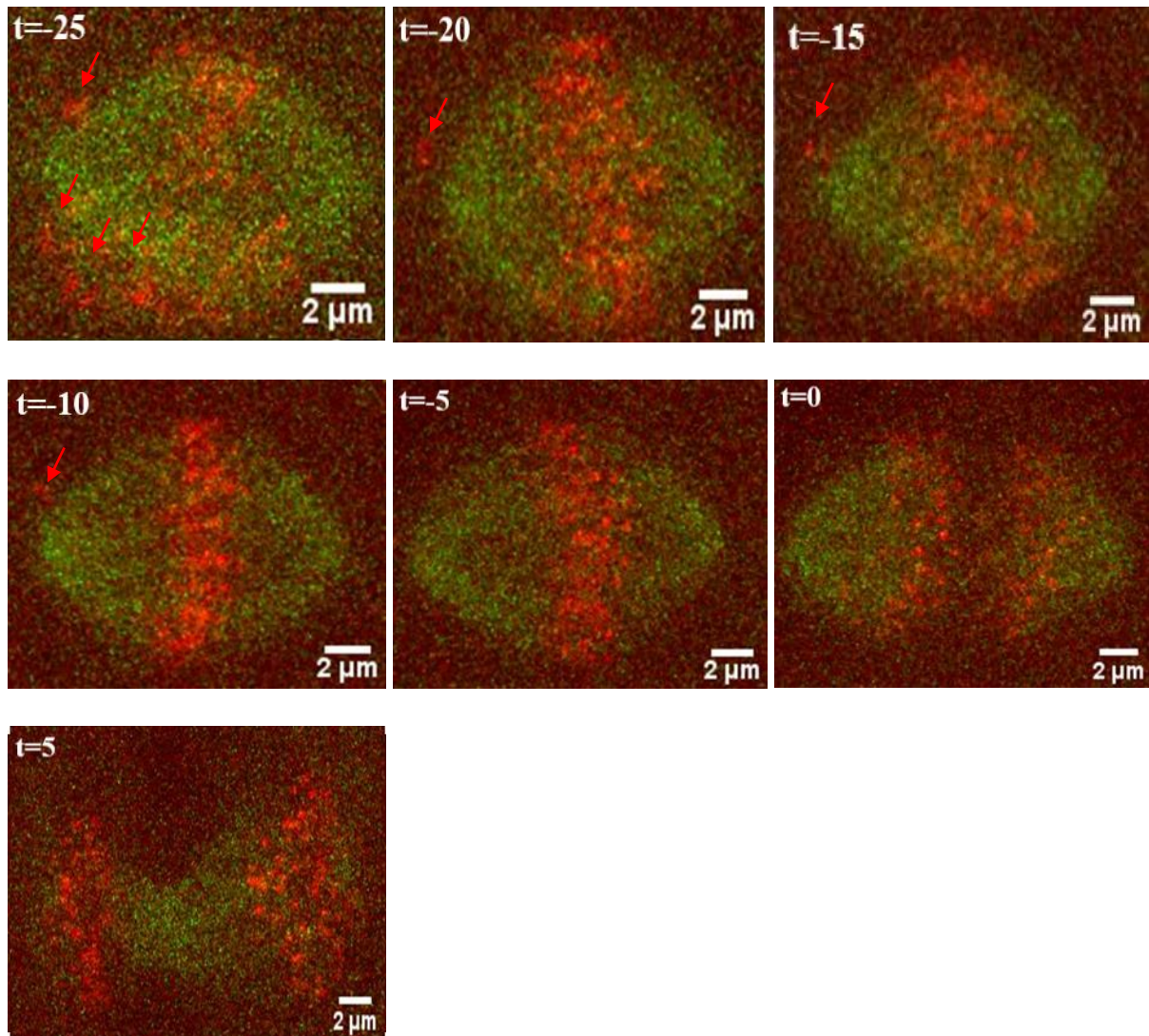
4.2.1. Trajanje mitoze je dulje u stanicama koje imaju nepotpunu kongresiju kromosoma u ekvatorijalnu ravninu

Prosječno trajanje mitoze u stanicama koje se dijele bez greške značajno je dulje ($p < 0,0001$) u staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin ($24,25 \pm 0,85$ min, $n=99$; slika 23) nego u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP ($14,97 \pm 0,61$ min, $n=93$). Isto vrijedi i za stanice koje pokazuju bilo koju vrstu zaostajućih kromosoma. Te stanice nemaju značajno različito vrijeme trajanja mitoze od onih koje se dijele bez greške. Stanice u kojima su prisutni mono-orijentirani kromosomi tijekom anafaze imaju značajno produljeno trajanje mitoze ($130,14 \pm 16,19$ min, $n=7$, $p < 0,0001$). Produljeno trajanje mitoze pokazuju i stanice koje se podijele bez greške ($67,12 \pm 4,82$; $n=54$, $p < 0,0001$; slika 24) i one u kojima su zabilježeni zaostajući kromosomi ($73,78 \pm 9,93$; $n=14$, $p < 0,0001$; slika 25), ali u nekom trenutku metafaze imaju prisutne mono-orijentirane kromosome čije se neispravno vezanje na mikrotubule ispravi. Ista pravilnost vrijedi i za trajanje metafaza u stanicama (slika 26). Početak

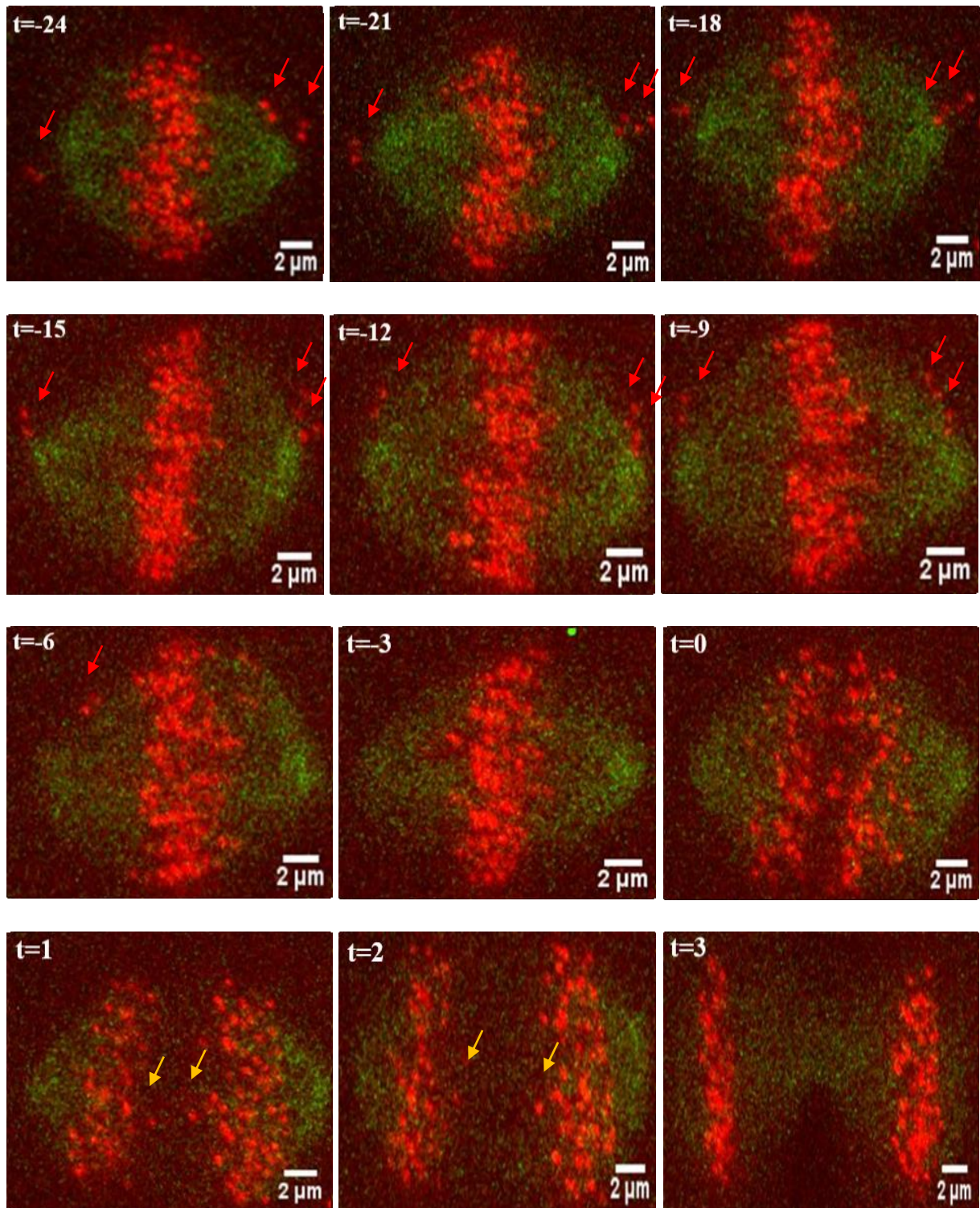
metafaza je definiran minutom u kojoj je većina kromosoma kongregirala u ekvatorijalnu ravninu stanice



Slika 23. Vremenski tijek mitoze. Stanica linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin koja se podijelila bez greške pri segregaciji. Vrijeme (t) 0 označava početak anafaze.

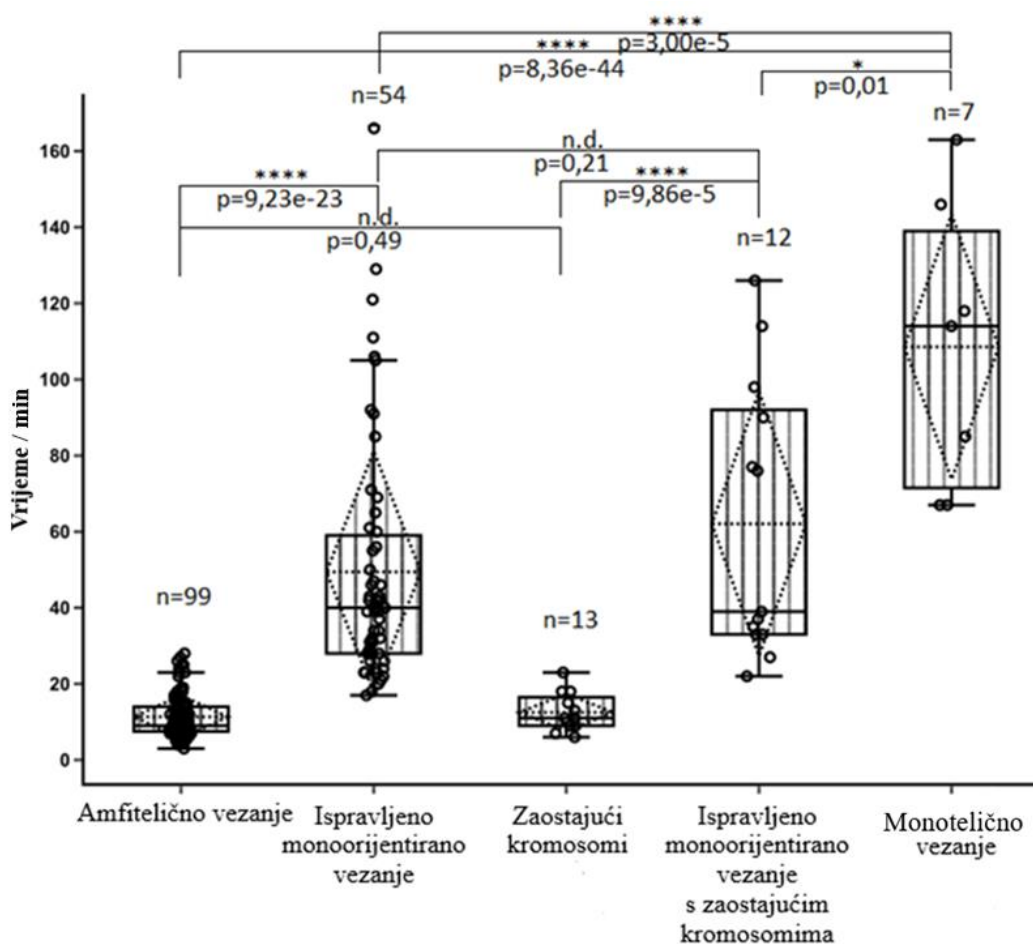


Slika 24. Odgođen početak anafaze zbog prisutnosti monoorijentiranih kromosoma. Metafaza stanice linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin traje duže od prosječne duljine za stanice s amfiteličnim vezanjem zbog prisutnosti monoorijentiranih kromosoma (crvena strelica) koji naposljetku ostvaraju amfitelično vezanje. Vrijeme (t) 0 označava početak anafaze.



Slika 25. Odgođen početak anafaze zbog prisutnosti monoorijentiranih kromosoma.

Metafaza stanice linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin traje duže od prosječne zbog prisutnosti monoorijentiranih kromosoma (crvena strelica) koji naposljetku ostvaruju amfitelično vezanje. U anafazi je vidljiv nastanak kromosomskog mosta (žuta strelica). Vrijeme (t) 0 označava početak anafaze.

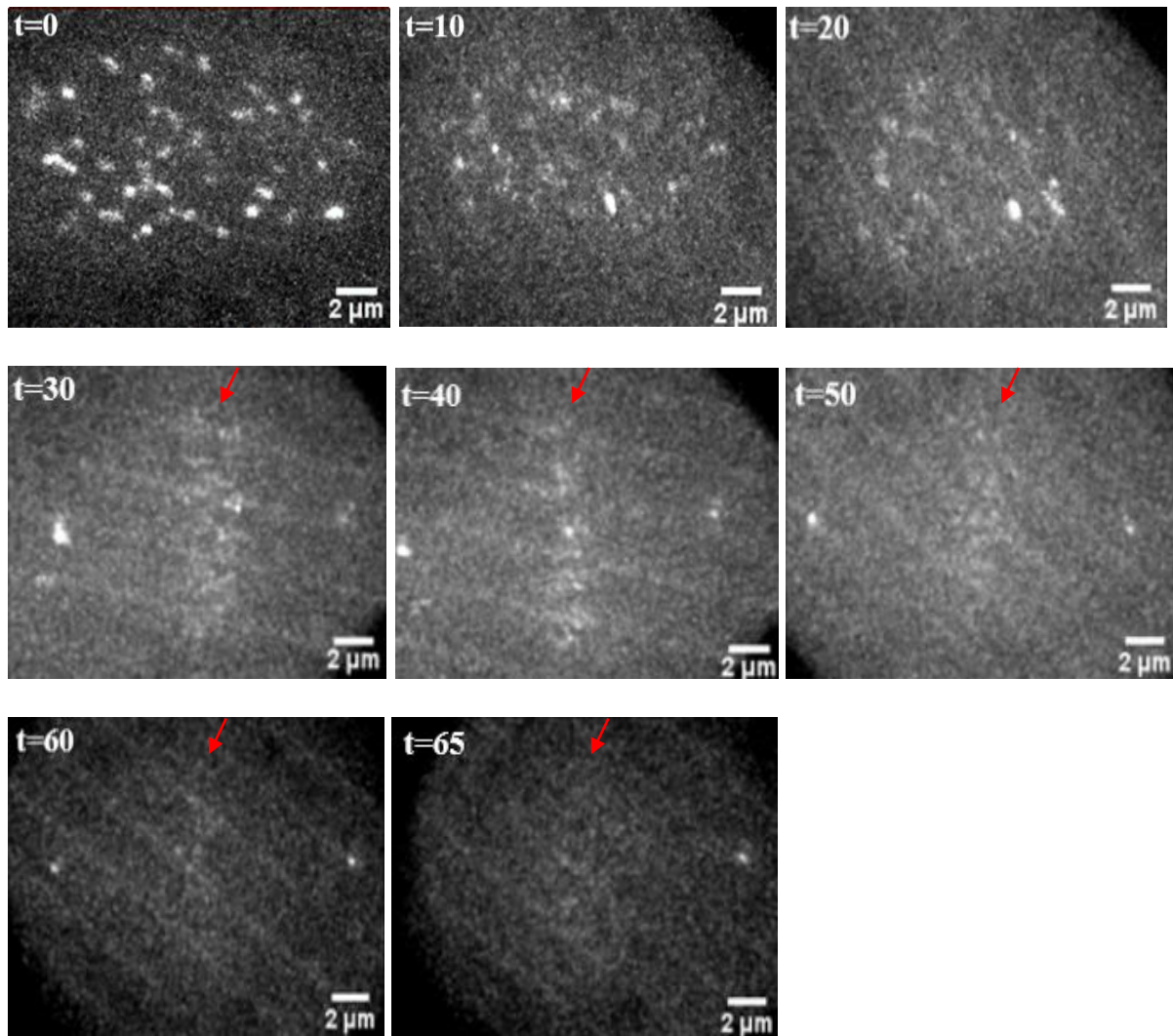


Slika 26. Vrijeme od početka metafaze do ulaska u anafazu stanica linije U2OS CENP-A-GFP tubulin-mCherry koje imaju ispravnu staničnu diobu i onih koje rezultiraju aneuploidijom. Izmjereno je trajanje metafaze za svaku stanicu te su duljine metafaza podijeljene u skupine prema ispravnosti diobe stanice. Prosječno trajanje metafaze stanica linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin koje se dijele bez greške je $12,97 \pm 0,98$ min. Stanice s zaostajućim kinetohoroma (merotelično vezanje i kromosomski most) imaju prosječno vrijeme trajanja metafaze $11,78 \pm 1,61$ min, što nije značajno različito od stanica s amfitelično vezanim kromosomima ($p=0,49$). Stanice koje se podijele iako mitotska kontrolna točka nije ispravila monotelično vezanje kinetohora imaju najduže trajanje metafaze ($109,18 \pm 14,22$ min), što je značajno različito od trajanja normalne diobe ($p < 0,0001$). Produžene metafaze uočene su i u stanicama koje u trenutku anafaze nemaju monoorijentirane kromosome, ali su ih imale u nekom dijelu metafaze te su ih naposljetku ispravile. One stanice koje se na kraju podijele ispravno jer su tijekom metafaze ispravile monoorijentirano vezanje u prosjeku se podijele za $47,29 \pm 4,62$ min. Isprekidana linija označava srednju vrijednost. Romb iscrtan

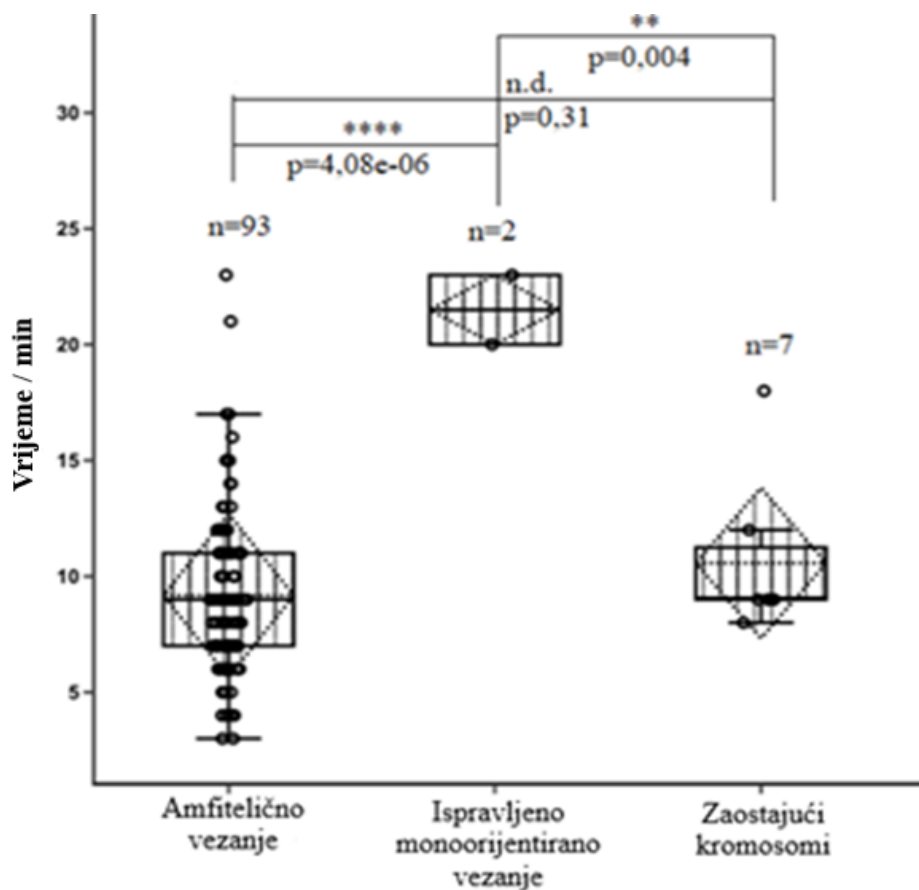
isprekidanom linijom označava standardnu devijaciju. Puna linija u kvadratu označava medija, a kvadrat označava prvi i treći kvartil.

4.2.2. Trajanje mitoze u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP produljeno je ukoliko su bili prisutni monoorijentirani kromosomi

Trajanje mitoze u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP nema značajne razlike ($p=0,47$) između stanica koje se dijele bez greške ($19,01 \pm 0,89$ min, $n=93$) i stanica koje pokazuju neku vrstu zaostajućih kromosoma ($17,45 \pm 2,66$ min, $n=7$). Stanica koja se nije podijelila imala je produljeno vrijeme metafaze, te nije ušla u anafazu već je signal nakon 37 minuta u metafazi počeo blijediti. Ista je stanica imala i produljeno vrijeme prometafaze (slika 27). Značajno produljeno ($p < 0,0001$) vrijeme do ulaska u anafazu imale su stanice koje su tijekom mitoze imale prisutne monoorijentirane kromosome, ali su ispravile pogrešno vezanje ($31,36 \pm 2$ min, $n=2$). Sličan je obrazac primijećen i mjerenjem duljina metafaza (slika 28). Početak metafaza je definiran minutom u kojoj je većina kromosoma kongregirala u ekvatorijalnu ravninu stanice.



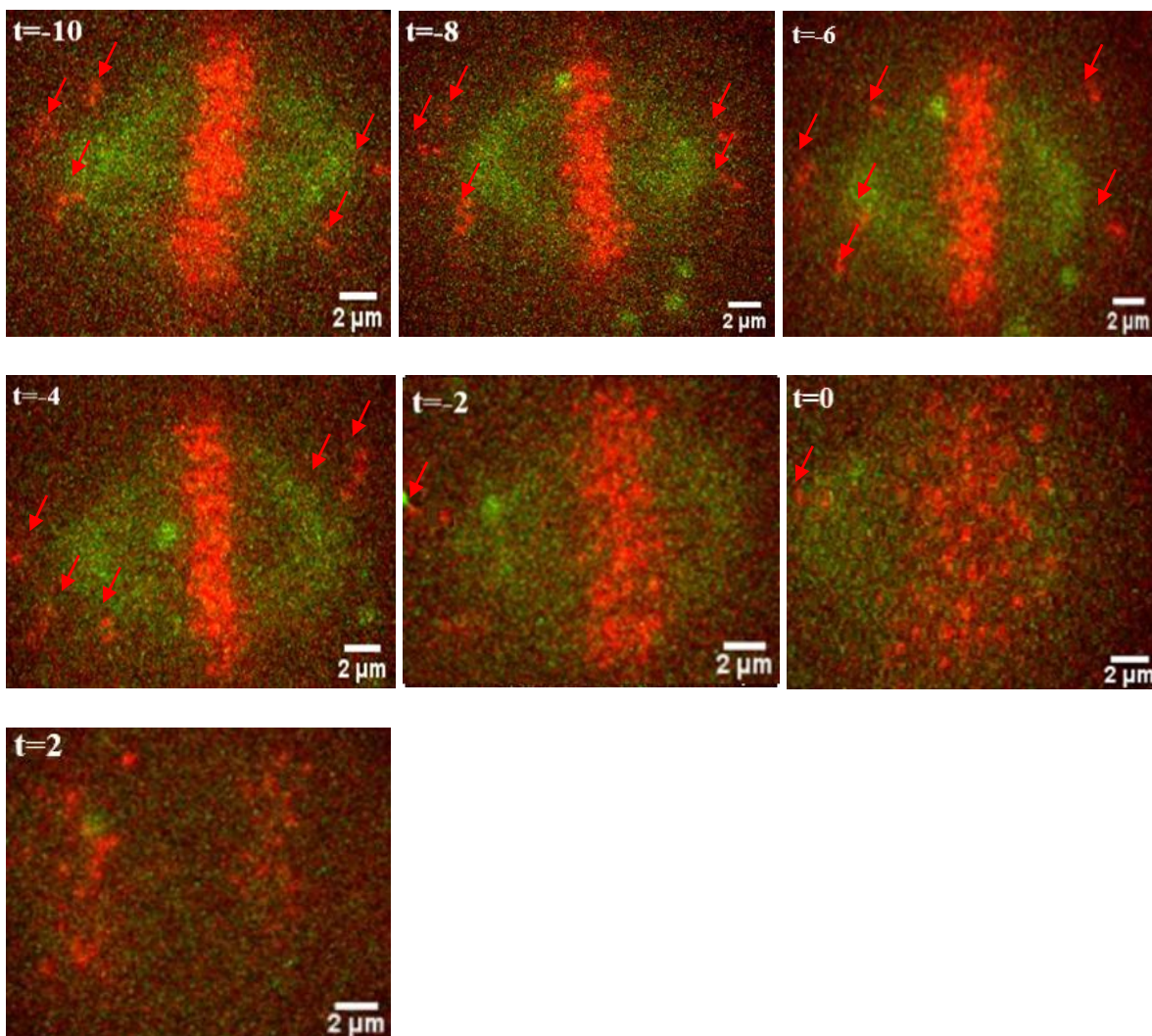
Slika 27. Stanica koja se nije podijelila. Snimka stanice koja se tijekom 65 minuta od početka snimanja ($t=0$) nije podijelila, a signal kinetohora je izbledio (crvena strelica).



Slika 28. Vrijeme od početka metafaze do ulaska u anafazu stanica linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP koje imaju ispravnu staničnu diobu i onih koje rezultiraju aneuploidijom. Izmjereno je trajanje metafaze za svaku stanicu te su duljine metafaza podijeljene u skupine prema ispravnosti diobe stanice. Stanice linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP u kojih su svi kromosomi amfitelično vezani na mikrotubule diobenog vretena imaju prosječno trajanje metafaze $9,07 \pm 0,45$ min. Nema značajne razlike ($p=0,58$) ni u trajanju prijelaza iz metafaze u anafazu u stanicama u kojima je zabilježena neka vrsta zaostajućih kromosoma ($10,14 \pm 1,32$ min). Stanice koje su se ispravno podijele, ali su tijekom metafaze imale prisutne monoorijentirane kromosome čije su vezanje na mikrotubule ispravile, imaju značajno veće ($p < 0,0001$) prosječno vrijeme potrebno za ulazak u anafazu ($22,35 \pm 1,50$ min). Iz prikaza je izostavljena stanica koja nije ni ušla u anafazu ni nakon 37 min, već je signal kinetohora počeo blijediti. Isprekidana linija označava srednju vrijednost. Romb iscrtan isprekidanom linijom označava standardnu devijaciju. Puna linija u kvadratu označava medija, a kvadrat označava prvi i treći kvartil.

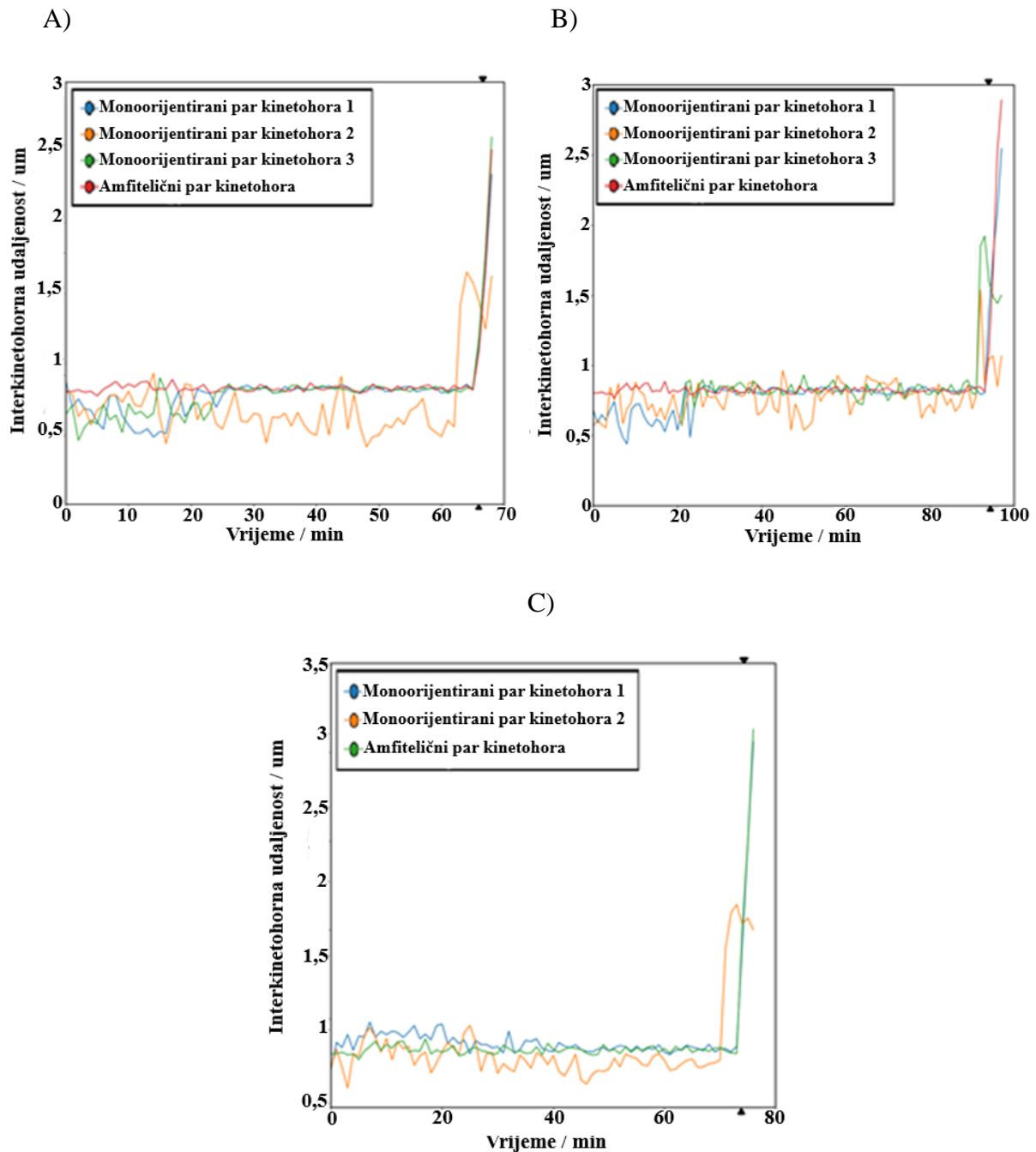
4.3.1. Interkinetohorna udaljenost monoorijentiranih kromosoma pokazuje velike varijacije te se naglo povećava nekoliko minuta prije anafaze

Prosječna interkinetohorna udaljenost (d_{KC}) metafaznog para kinetohora u staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin iznosi $0,826 \pm 0,005 \mu\text{m}$ ($n=147$). Monoorijentirani kromosomi pokazuju velike fluktuacije u interkinetohornoj udaljenosti, dok prosječna d_{KC} vrijednost iznosi $0,648 \pm 0,017 \mu\text{m}$ ($n=72$). Neposredno prije početka anafaze ($1,7 \pm 0,5 \text{ min}$) primijećeno je da se interkinetohorna udaljenost počne značajno povećavati ($p=0,006$) na udaljenost od $1,735 \pm 0,111 \mu\text{m}$ ($n=7$) što signalizira razdvajanje sestrinskih kromatida prije same anafaze (slika 29 i slika 30).



Slika 29. Interkinetohorna udaljenost monoorijentiranog para kinetohora mijenja se tijekom metafaze i naglo naraste neposredno prije anafaze. U staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin uočeno je da d_{KC} vrijednost monoorijentiranog para

(crvene strelice) kinetohora varira tijekom metafaze i naraste nekoliko minuta prije anafaze (t=0). Prikazana je stanica A) sa slike 30.

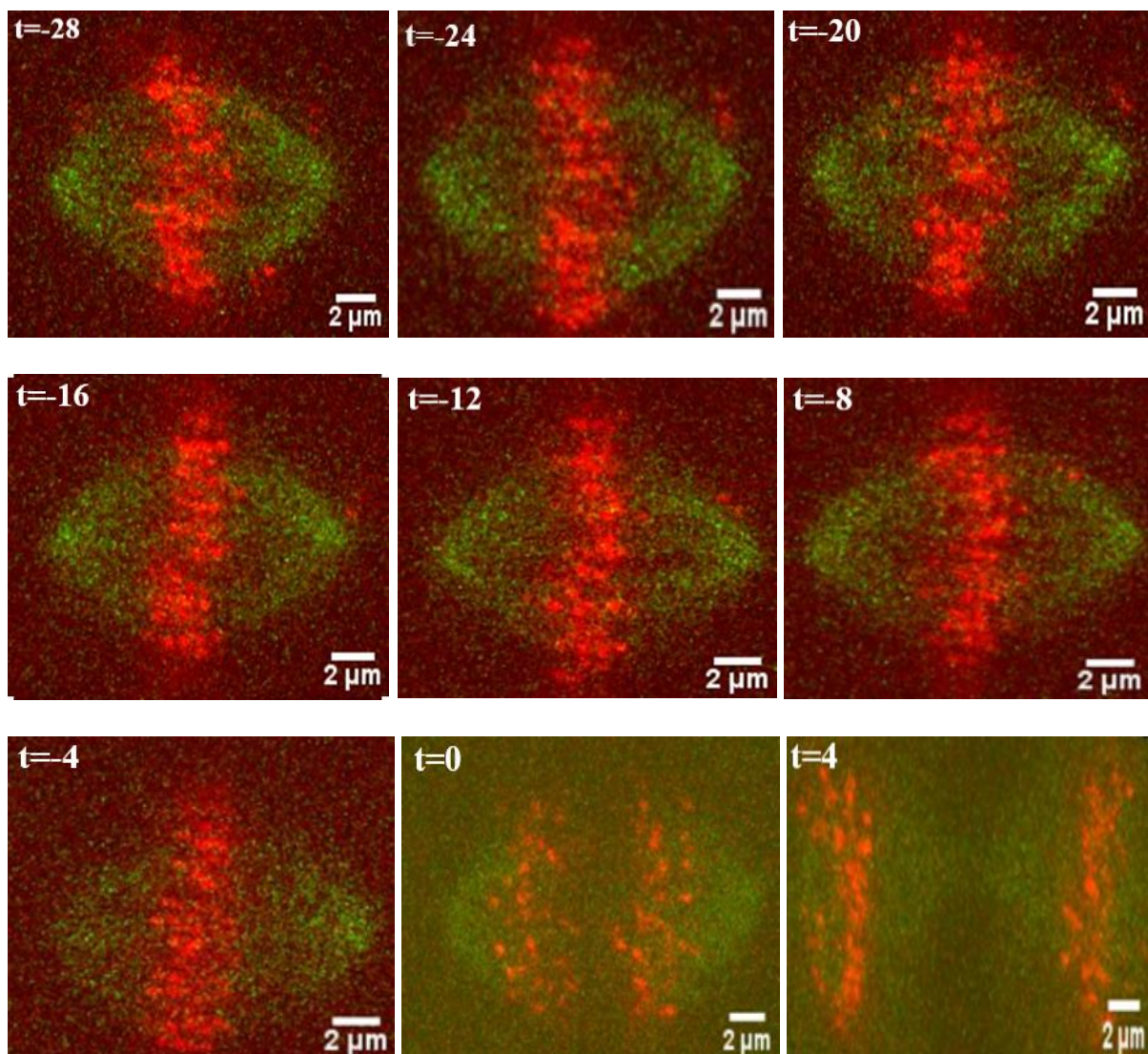


Slika 30. Promjena interkinetohorne udaljenosti monoorijentiranih kinetohora koje rezultiraju greškom u anafazi u stanicama linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin. Interkinetohorna udaljenost dviju monoorijentiranih sestrinskih kinetohora prikazana je u ovisnosti o vremenu (1 min). Interkinetohorne udaljenosti monoorijentiranih parova kinetohora (slike A i B plavo, narančasto i zeleno; slika C plavo i narančasto) variraju tijekom mitoze ($d_{\text{KC}} = 0,624 \pm 0,017 \mu\text{m}$) te se neposredno prije anafaze

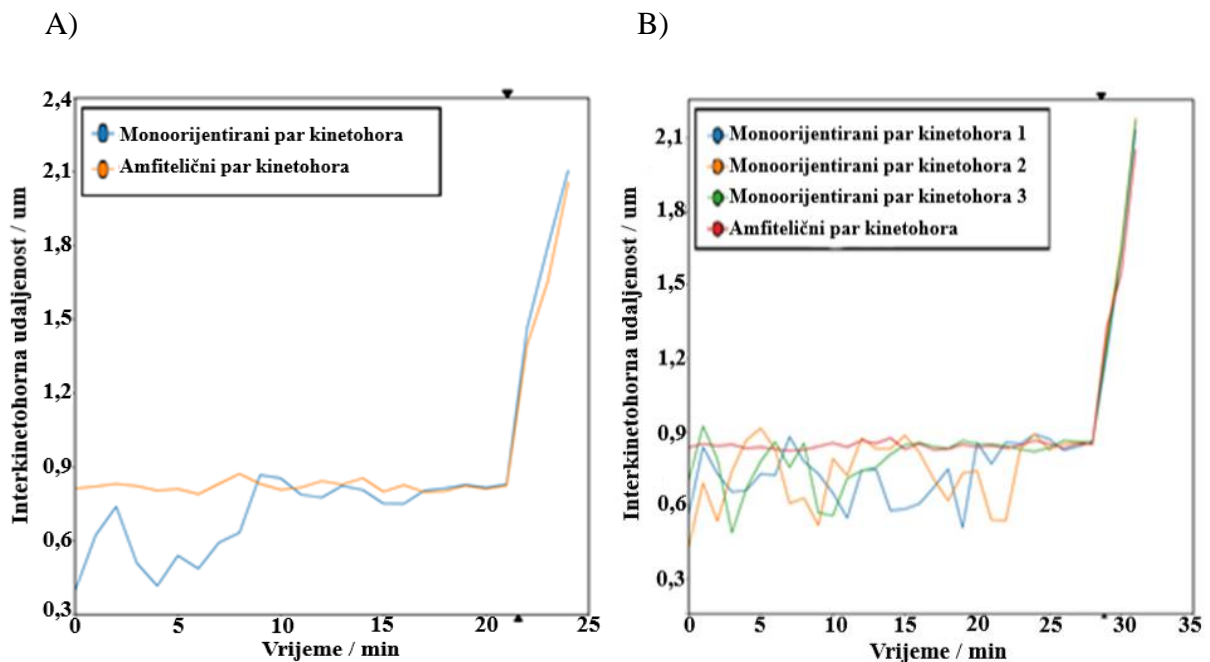
naglo povećaju. Nakon tog povećanja, nema drugih većih varijacija. Interkinetohorne udaljenosti parova u ekvatorijalnoj ravnini ujednačene su tijekom metafaze (slike A i B crveno; slika C zeleno). Primjeri A, B i C predstavljaju pojedinačne stanice. Crni trokut označava početak anafaze.

4.3.2. Interkinetohorna udaljenost kromosoma koji kasne s kongresijom u ekvatorijalnu ravninu varira do njihovog pozicioniranja u ekvatorijalnoj ravnini stanice

Varijacija interkinetohorne udaljenosti primijećena je i kod monoorijentiranih parova kinetohora u stanica koje se podijele bez greške, ali su prethodno imale prisutne monotelično vezene kromosome čije su vezanje ispravile. Kod njih je vidljivo da neposredno prije nego što kongregiraju u ekvatorijalnu ravninu dolazi do ustaljivanja vrijednosti interkinetohorne udaljenosti na vrijednost amfitelično vezanih kinetohornih parova ($0,803 \pm 0,019 \mu\text{m}$, $n=15$). Nekoliko minuta ($4,15 \pm 0,25 \text{ min}$) nakon što se svi kromosomi nađu u ekvatorijalnoj ravnini stanice dolazi do početka anafaze (slika 31 i slika 32).



Slika 31. Dioba stanica koje su u jednom dijelu metafaze imale prisutne monoorijentirane kromosome. Stanice linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin koje uspiju popraviti monotelično vezanje kinetohora na mikrotubule dijele se nekoliko minuta nakon uspostave amfiteličnog vezanja. Prikazana je stanica A sa slike 32.

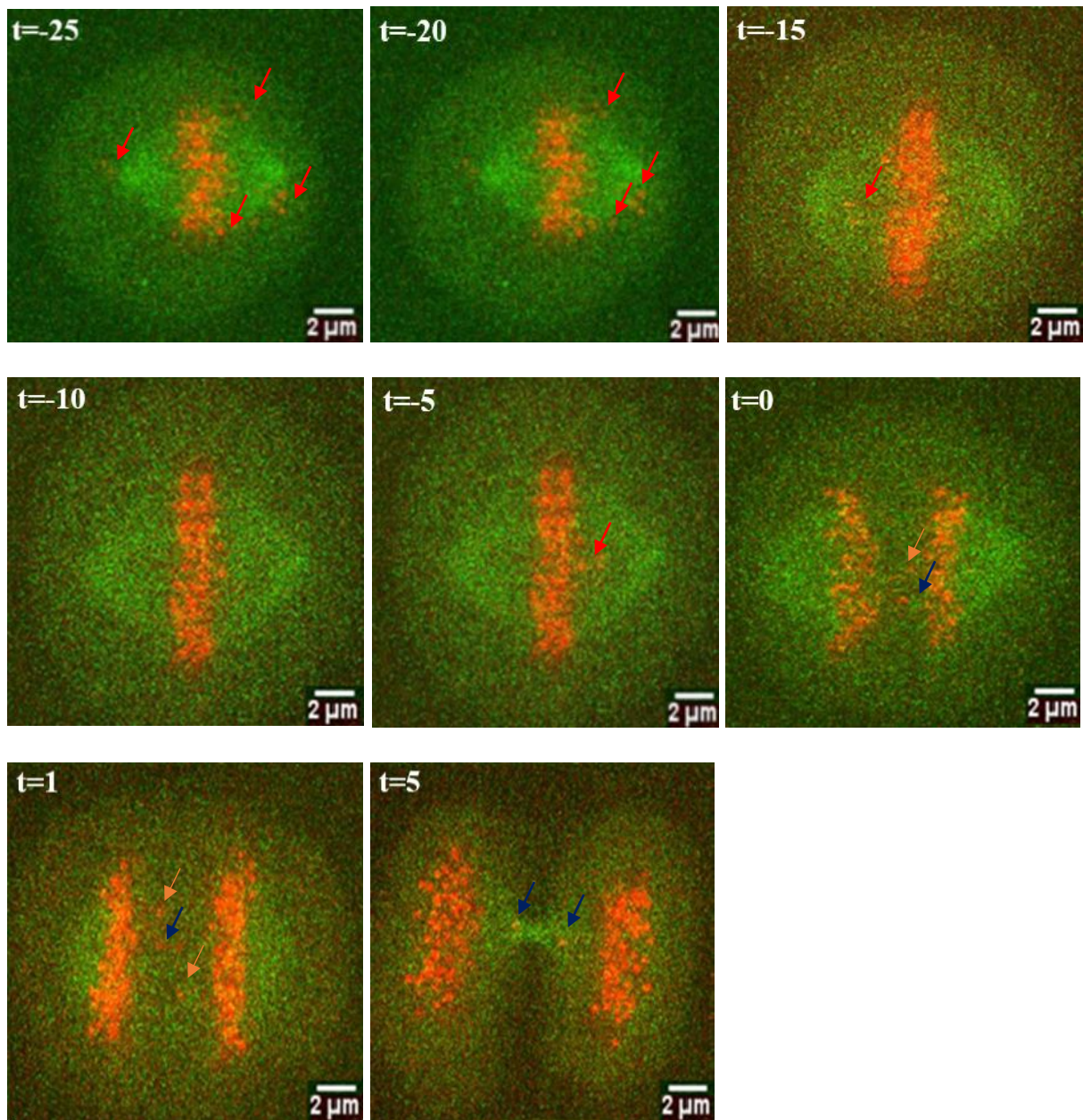


Slika 32. Promjena interkinetohorne udaljenosti monoorijentiranih kinetohora koje ne rezultiraju greškom u anafazi u stanicama linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin. Interkinetohorna udaljenost dviju monoorijentiranih sestrinskih kinetohora u ovisnosti o vremenu. Vremenski interval iznosi 1 min. Vrijednost interkinetohorne udaljenosti monoorijentiranih parova kinetohora (slika A plavo; slika B plavo, narančasto i zeleno) varira kada su blizu polova diobenog vretena ($d_{KC} = 0,627 \pm 0,026 \mu\text{m}$, $n=67$). Kada se približe ekvatorijalnoj ravnini gdje se nalaze ostali parovi kinetohora, interkinetohorna udaljenost se stabilizira ($d_{KC} = 0,803 \pm 0,019 \mu\text{m}$, $n=15$). Nekoliko minuta nakon stabilizacije vrijednosti d_{KC} u stanicama blizu onima kinetohora u ekvatorijalnoj ravnini (slika A narančasto; slika B crveno) kreće anafaza. Primjeri A i B predstavljaju pojedinačne stanice. Crni trokut označava početak anafaze.

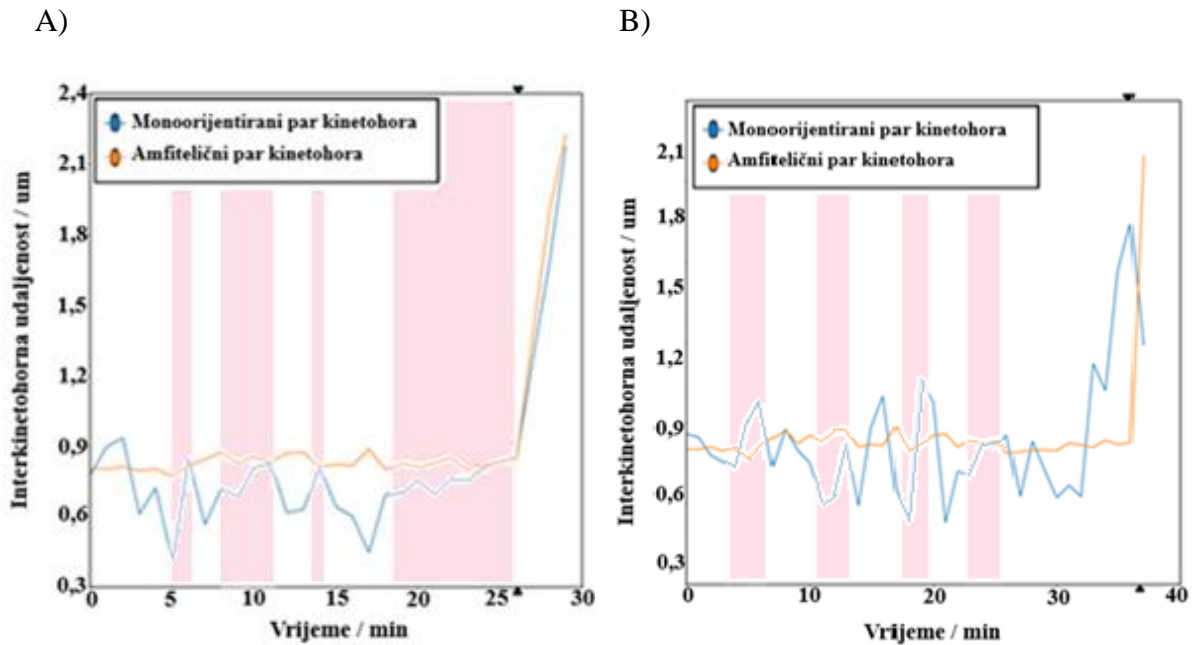
4.3.3. Interkinetohorna udaljenost kromosoma koji više puta migriraju s polova vretena u ekvatorijalnu ravninu i natrag na polove varira u skladu s monoorijentiranim kromosomima koji uzrokuju grešku

U stanicama linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin u kojima je primijećeno da postoji par kinetohora koji migrira od polova diobenog vretena do ekvatorijalne ravnine i

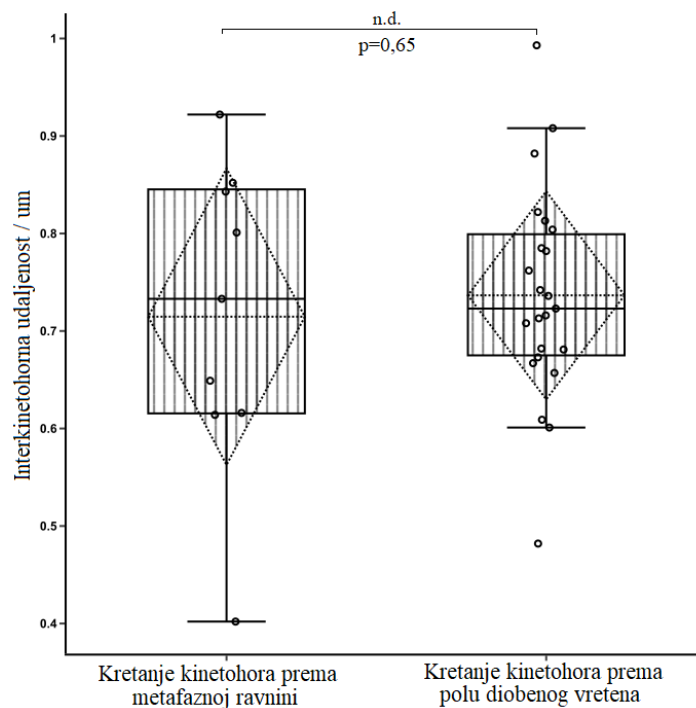
ponovno u suprotnom smjeru izmjerene interkinetohorne udaljenosti variraju ($0,704 \pm 0,025 \mu\text{m}$, $n=59$) slično kao i u stanicama koje se dijele s greškom (monoorijentirani kromosomi). U stanici u kojoj je u trenutku anafaze taj par kinetohora smješten u ekvatorijalnoj ravnini vidljiva je stabilizacija njegove interkinetohorne udaljenosti na onu izmjerenu u stanicama koje se dijele bez greške ($0,842 \pm 0,017 \mu\text{m}$, $n=38$, $p=0,0089$). U stanica u kojoj se taj par kinetohora nije smjestio u ekvatorijalnu ravninu prije početka anafaze, došlo je do odvajanja kinetohora nekoliko minuta prije anafaze, isto kao što je dolazilo i kod ostalih stanica s monoorijentiranim kromosomima (slika 33 i slika 34). Interkinetohorna udaljenost ne ovisi o smjeru kretanja kinetohora, $p=0,65$ (slika 35). Interkinetohorna udaljenost monoorijentiranog para kinetohora koji se kreće prema metafaznoj ravnini iznosi $0,736 \pm 0,022 \mu\text{m}$ ($n=23$), dok za onaj par koji se kreće prema polu diobenog vretena iznosi $0,715 \pm 0,054 \mu\text{m}$ ($n=23$). S druge strane, promjena interkinetohorne udaljenosti je ovisna o tome kreću li se kinetohore prema ekvatorijalnoj ravnini ili polu diobenog vretena, $p < 0,001$ (slika 36). Promjena interkinetohorne udaljenosti parova koji se kreću prema ekvatorijalnoj ravnini iznosi $0,057 \pm 0,012 \mu\text{m}$, dok promjena za one parove koji se kreću prema polu diobenog vretena iznosi $0,178 \pm 0,019 \mu\text{m}$. Nema ovisnosti između interkinetohorne udaljenosti (slika 37) te promjene interkinetohorne udaljenosti (slika 38) i brzine kretanja kinetohora.



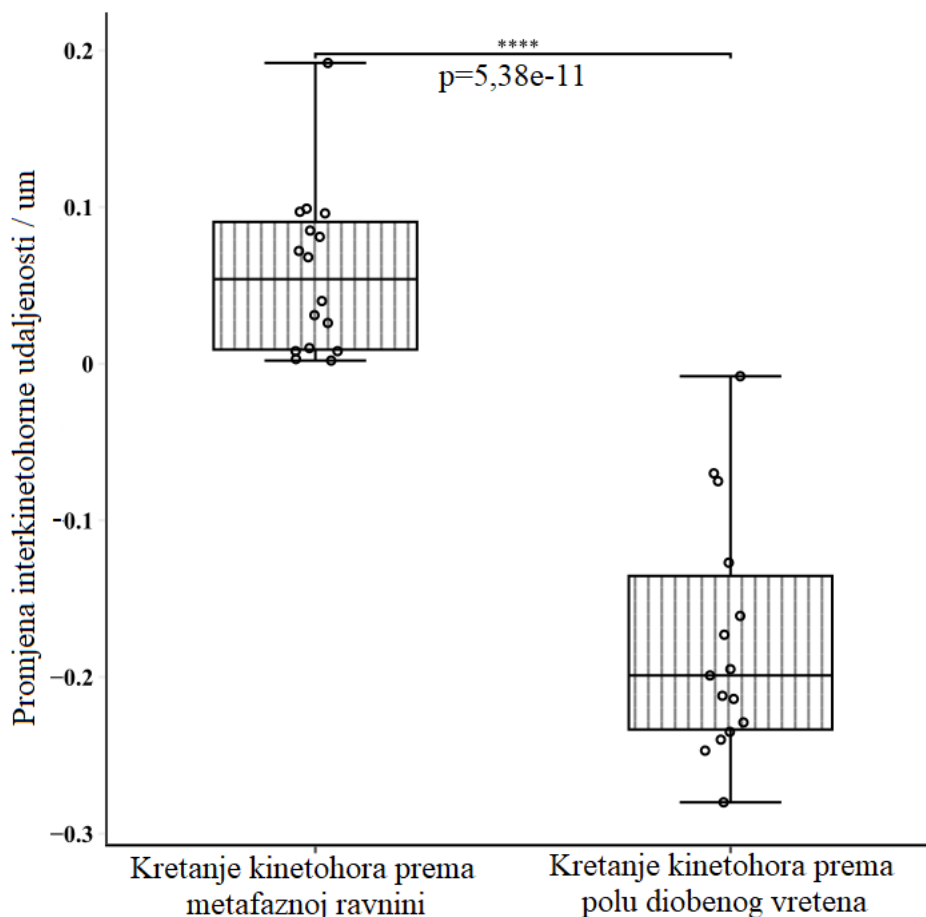
Slika 33. Dioba stanica u kojima kromosomi više puta putuju od pola diobenog vretena do ekvatorijalne ravnine stanice. U nekoliko stanica linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin monoorijentirani kromosomi (crvena strelica) često putuju od pola diobenog vretena do ekvatorijalne ravnine stanice. Prema njihovoj interkinetohornoj udaljenosti neposredno prije anafaze moguće je odrediti je li došlo do uspostave amfitelične konfiguracije ili nije. U ovom slučaju stanica se podijelila iako su monoorijentirani kromosomi bili prisutni. U stanici su prisutne i dvije merotelčno vezane kinetohore (narančasto) te kromosomski most (plavo). Vrijeme (t) 0 označava početak anafaze. Prikazana je stanica A sa slike 34.



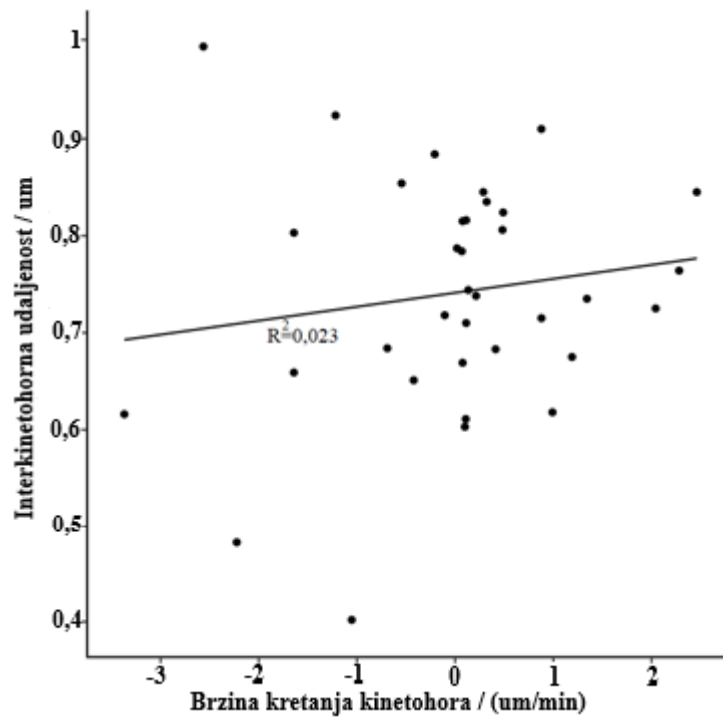
Slika 34. Promjena interkinetohorne udaljenosti monoorijentiranih kinetohora koje se više puta gibaju od polova do ekvatorijalne ravnine u stanicama linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin. Interkinetohorna udaljenost dviju monoorijentiranih sestrinskih kinetohora u ovisnosti o vremenu. Vremenski interval iznosi 1 min. A) Stanica pokazuje ponašanje karakteristično za slučajeve u kojima nije došlo do greške. Interkinetohorna udaljenost monoorijentiranog para kinetohora (plavo) varira neko vrijeme, no neposredno pred anafazu se ujednači s vrijednošću d_{KC} parova u ekvatorijalnoj ravnini (narančasto). U vremenskim periodima kada je stanica bliže ekvatorijalnoj ravnini nego polu diobenog vretena (ružičasto) interkinetohorna udaljenost raste. B) Stanica kod koje je vidljivo da je u trenutku anafaze prisutan monoorijentirani par kinetohora. Interkinetohorna udaljenost monoorijentiranog para kinetohora (plavo) varira do nekoliko minuta prije početka anafaze kad naglo naraste. Interkinetohorna udaljenost parova kinetohora u ekvatorijalnoj ravnini (narančasto) ujednačena je za trajanja metafaze. Primjeri A i B predstavljaju pojedinačne stanice. Crni trokut označava početak anafaze.



Slika 35. Interkinetohorna udaljenost u ovisnosti o smjeru kretanja kinetohora. Izmjerena je interkinetohorna udaljenost dviju monoorijentiranih sestrinskih kinetohora te podijeljena u grupe ovisno o tome je li pomak u tom vremenskom intervalu bio prema metafaznoj ravnini stanice ili prema polu diobenog vretena. Nema značajne razlike ($p=0,65$) u interkinetohornoj udaljenosti ovisno o tome kreću li se kinetohore prema metafaznoj ravnini ili prema polu diobenog vretena. Isprekidana linija označava srednju vrijednost. Romb iscrtan isprekidanom linijom označava standardnu devijaciju. Puna linija u kvadratu označava medija, a kvadrat označava prvi i treći kvartil.

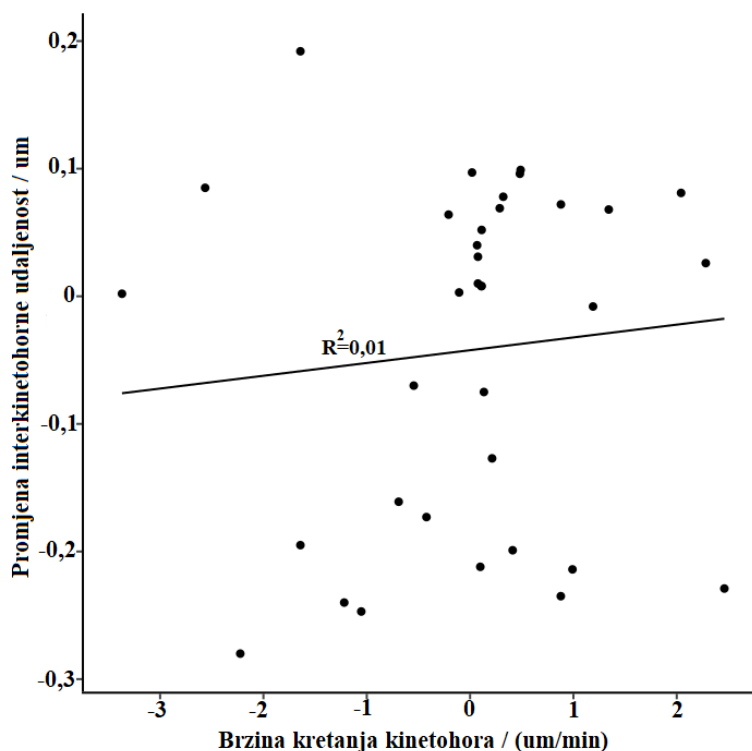


Slika 36. Promjena interkinetohorne udaljenosti u ovisnosti o smjeru kretanja kinetohora. Izmjerena je promjena interkinetohorne udaljenosti monoorijentiranog para sestrinskih kinetohora u vremenskom intervalu od jedne minute. Vrijednosti su podijeljene u dvije skupine, ovisno o tome je li se u tom vremenskom intervalu monoorijentirani par sestrinskih kinetohora kretao prema metafaznoj ravnini stanice ili prema polu diobenog vretena. Interkinetohorna udaljenost se značajno više mijenja ($p < 0,0001$) kada se kinetohore kreću prema polu diobenog vretena nego kada se kreću prema metafaznoj ravnini. Pozitivne vrijednosti promjene interkinetohorne udaljenosti su mjerene kada se par kinetohora kretao prema ekvatorijalnoj ravnini stanice, a negativne vrijednosti kada se kretao prema polu diobenog vretena. Isprekidana linija označava srednju vrijednost. Romb iscrtan isprekidanom linijom označava standardnu devijaciju. Puna linija u kvadratu označava medija, a kvadrat označava prvi i treći kvartil.



Slika 37. Ovisnost interkinetohorne udaljenosti o brzini kretanja kinetohora.

Interkinetohorna udaljenost monoorijentiranog para sestrinskih kinetohora prikazana je u ovisnosti o brzini kretanja kinetohora. Brzina je određena dijeljenjem pomaka monoorijentiranog para sestrinskih kinetohora s vremenskim intervalom (1 min). Interkinetohorna udaljenost ne ovisi o brzini kretanja kinetohora ($p=0,65$). Pozitivne vrijednosti brzine kretanja kinetohora su u smjeru ekvatorijalne ravnine, a negativne vrijednosti brzine kretanja kinetohora su u smjeru pola diobenog vretena.



Slika 38. Ovisnost promjene interkinetohorne udaljenosti o brzini kretanja kinetohora.

Promjena interkinetohorne udaljenost monoorijentiranog para sestrinskih kinetohora (u vremenskom intervalu od jedne minute) prikazana je u ovisnosti o brzini kretanja kinetohora. Brzina je određena dijeljenjem pomaka monoorijentiranog para sestrinskih kinetohora s vremenskim intervalom (1 min). Promjena interkinetohorne udaljenosti ne ovisi o brzini kretanja kinetohora ($p=0,74$). Pozitivne vrijednosti brzine kretanja kinetohora su u smjeru ekvatorijalne ravnine, a negativne vrijednosti brzine kretanja kinetohora su u smjeru pola diobenog vretena. Pozitivne vrijednosti interkinetohorne udaljenosti su mjerene kada se par kinetohora kretao prema ekvatorijalnoj ravnini stanice, a negativne vrijednosti kada se kretao prema polu diobenog vretena.

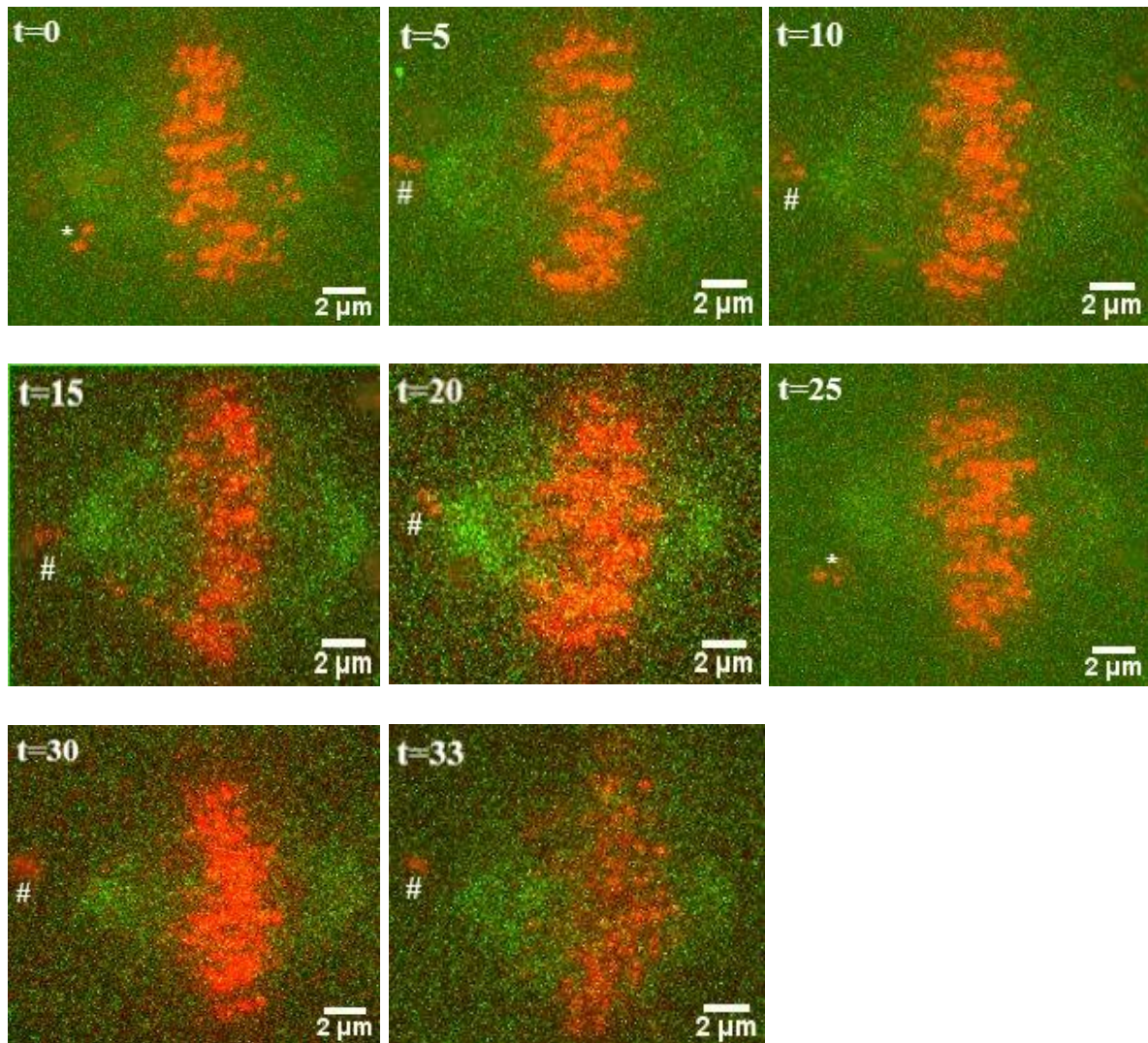
Sažetak glavnih mjerenja napravljenih za staničnu liniju U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin nalazi se u tablici 1.

Tablica 1. Promjenjive varijable u staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin. Vrijeme mitoze (t) značajno se razlikuje ($p < 0,0001$) kod monotelično vezanih kinetohora u usporedbi s amfiteličnim i meroteličnim vezanjem. Interkinetohorna udaljenost (d_KC) značajno je manja ($p < 0,0001$) kod para kinetohora koji ostvaruje monotelično vezanje, no promjena interkinetohorne udaljenosti u vremenskom intervalu od jedne minute (Δd_{KC}) u tom je slučaju značajno veća ($p < 0,0001$) od onih pri amfiteličnom i meroteličnom vezanju. Brzina kretanja kinetohora (v_KC) značajno je veća ($p < 0,001$) za monotelično vezane kinetohore koje se zbog načina vezanja slobodnije kreću po stanici nego za amfitelično i merotelično vezane kinetohore koje se nalaze u ekvatorijalnoj ravnini stanice.

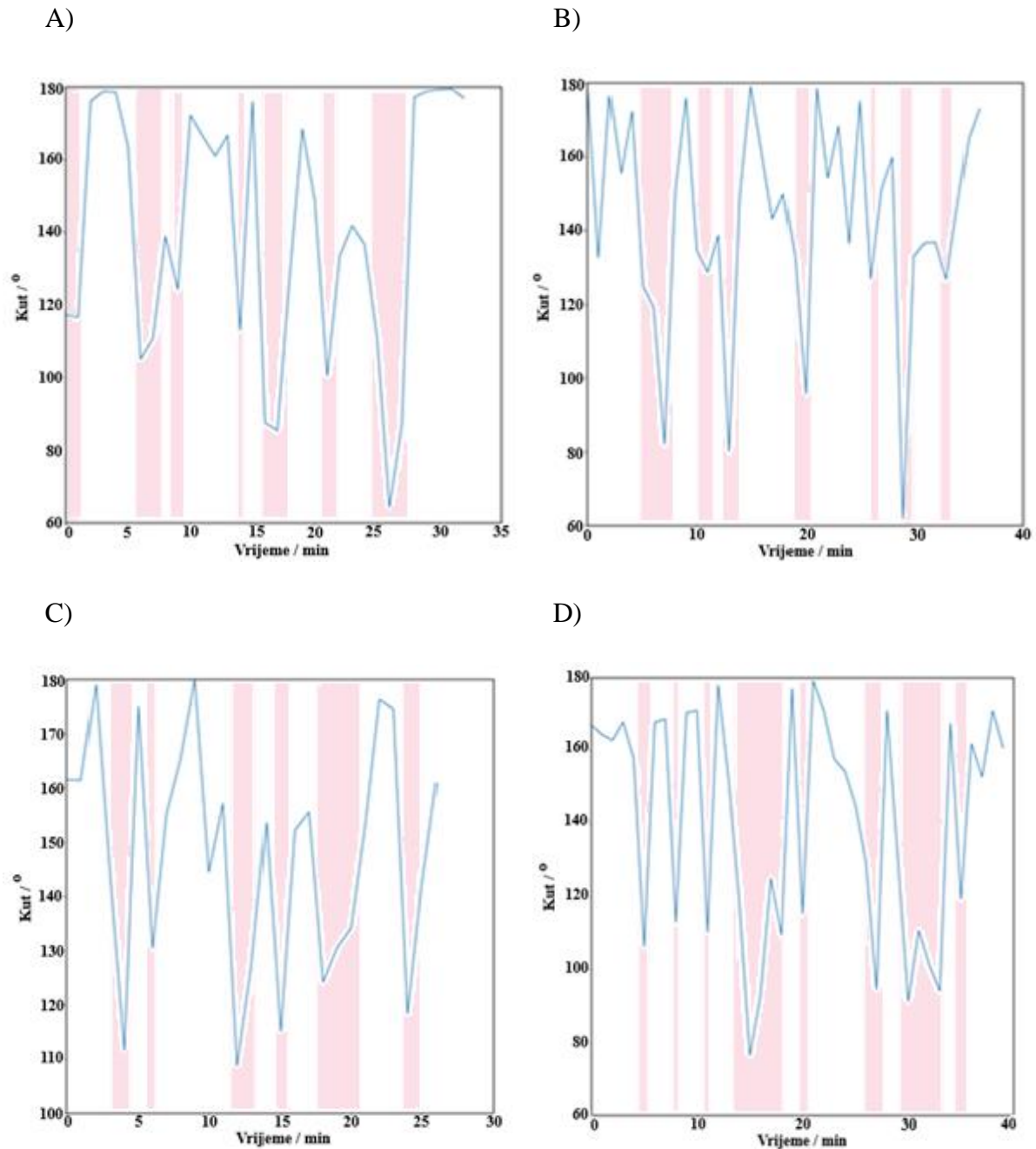
	t (mitoza)/min	d_KC/ μm	$\Delta d_{KC}/\mu\text{m}$	v_KC/($\mu\text{m}/\text{min}$)
Amfitelično vezanje	$24,25 \pm 0,85$	$0,826 \pm 0,005$	$0,093 \pm 0,011$	$0,141 \pm 0,22$
Merotelično vezanje	$25,19 \pm 0,73$	$0,824 \pm 0,007$	$0,108 \pm 0,024$	$0,184 \pm 0,17$
Monotelično vezanje	$130,14 \pm 16,19$	$0,648 \pm 0,017$	$0,329 \pm 0,014$	$0,879 \pm 0,15$

4.4.1. Kromosomi pogrešno segregiraju zbog monoteličnog vezanja

Mjerenje kuta koji zatvara pol diobenog vretena s monoorijentiranim parom kinetohora sugerira da je minutu prije anafaze tip vezanja kinetohora na mikrotubule monotelija ($168,96 \pm 4,00^\circ$, $n=10$). Izmjenjivanje vezanja u diobenom vretenu je vrlo dinamično pa se neprestano izmjenjuju monotelija i sintelija (slika 39 i slika 40).



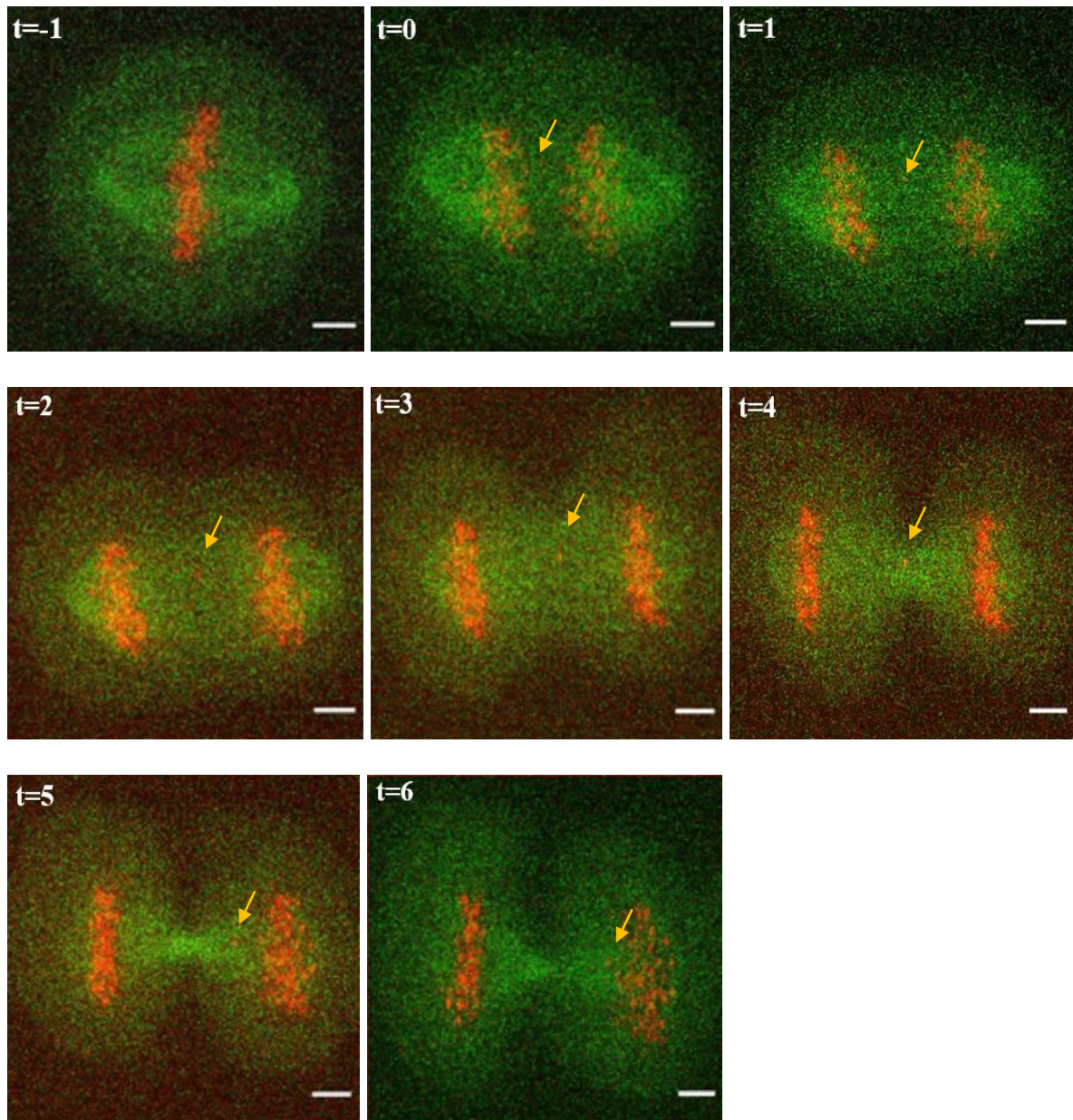
Slika 39. Dinamična izmjena monoteličnog i sinteličnog vezanja kinetohora. Mjerenjem unutarnjeg kuta između pola diobenog vretena i monoorijentiranog para kinetohora sugerira da se tijekom metafaze kontinuirano izmjenjuju sintelična (*) i monotelična (#) vezanja mikrotubula na kinetohore. Na početku anafaze (t=33) kinetohore blizu pola su monotelično vezane na mikrotubule diobenog vretena. Vrijeme (t) 0 označava početak praćenja kinetohora u metafazi. Stanica predstavlja vremenski tijek primjera A iz slike 40.



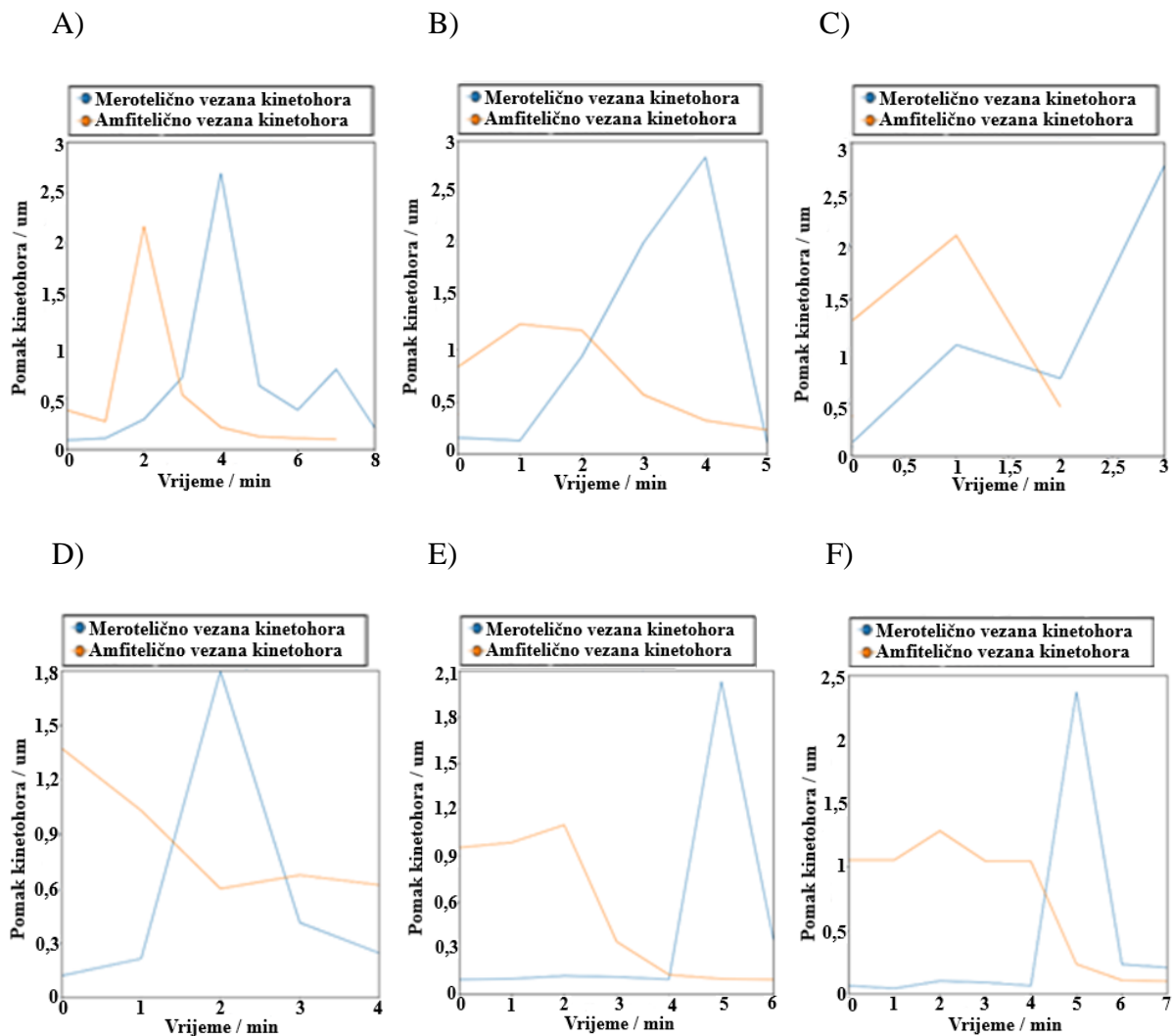
Slika 40. Monotelijom izazvana pogrešna segregacija kromosoma. Mjerenja unutarnjeg kuta između pola diobenog vretena i monoorijentiranog para kinetohora (plava linija) indirektni su pokazatelj da je tip vezanja u trenutku anafaze monotelija ($168,96 \pm 4,00^\circ$, $n=10$). Izmjena mikrotubula na kinetohorama je vrlo dinamična te se vide učestali prijelazi između monoteličnog (bijelo polje) i sinteličnog (ružičasto polje) vezanja. Zadnja minuta na dijagramu označava minutu prije početka anafaze, a minuta 0 označava početak praćenja kinetohora u metafazi. Primjeri A, B, C i D predstavljaju pojedinačne stanice.

4.5.1. Merotelično vezane kinetohore stanične linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin se počinju gibati tek nekoliko minuta nakon početka anafaze uz veliki inicijalni pomak

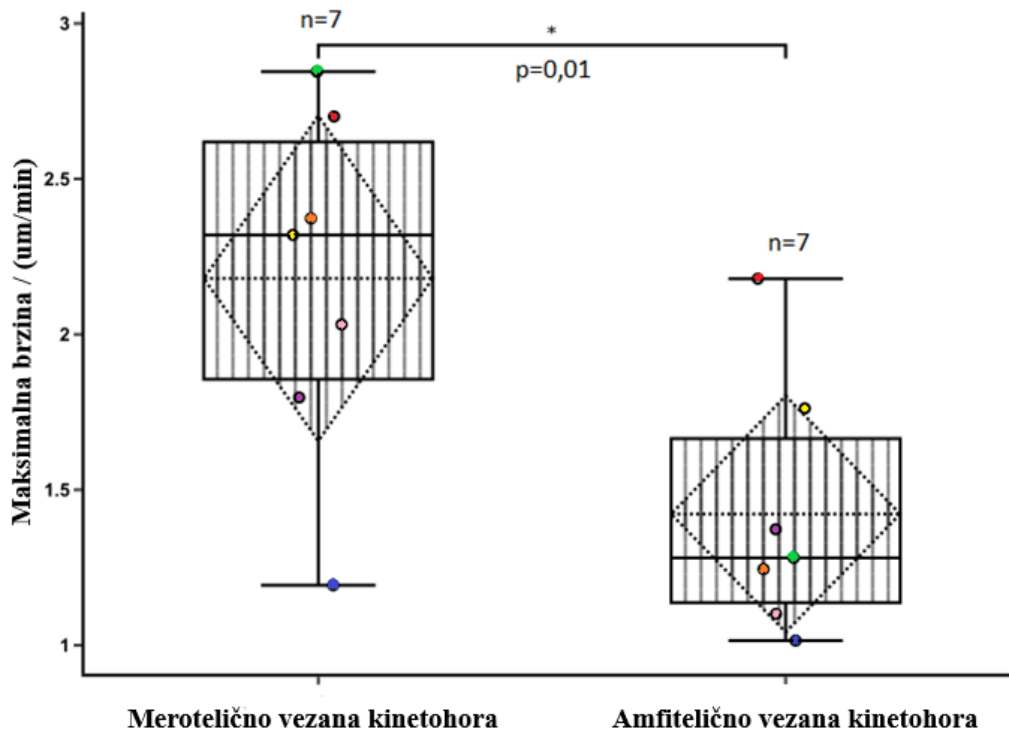
Mjerenjem brzine kretanja merotelično vezanih kinetohora stanične linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin (slika 41) utvrđeno je da se u prve tri minute nakon početka anafaze one gibaju vrlo sporo ($0,122 \pm 0,011 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=21$) u odnosu na ekvatorijalnu ravninu stanice. S druge strane, za to se vrijeme amfitelično vezane kinetohore kreću brzinom od $0,953 \pm 0,062 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=21$) što je značajno veće ($p < 0,001$). Nekoliko minuta nakon početka anafaze merotelično vezane kinetohore počinju se ubrzano kretati ($2,18 \pm 0,21 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=7$) prema polovima diobenog vretena (slika 42) u odnosu na početnu poziciju u ekvatorijalnoj ravnini. Najveća brzina koju postižu merotelično vezane kinetohore značajno je veća nego najveća brzina koju tijekom anafaze postižu amfitelično vezane kinetohore ($1,42 \pm 0,15 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=7$; $p=0,014$) (slika 43).



Slika 41. Kretanje merotelično vezane kinetohore nakon početka anafaze. Merotelično vezana kinetohora (žuta strelica) nekoliko se minuta kreće vrlo sporo i zaostaje u ekvatorijalnoj ravnini, a tek onda kreće prema polu diobenog vretena. Vrijeme (t) 0 označava početak anafaze. Prikazana je stanica A sa slike 42.



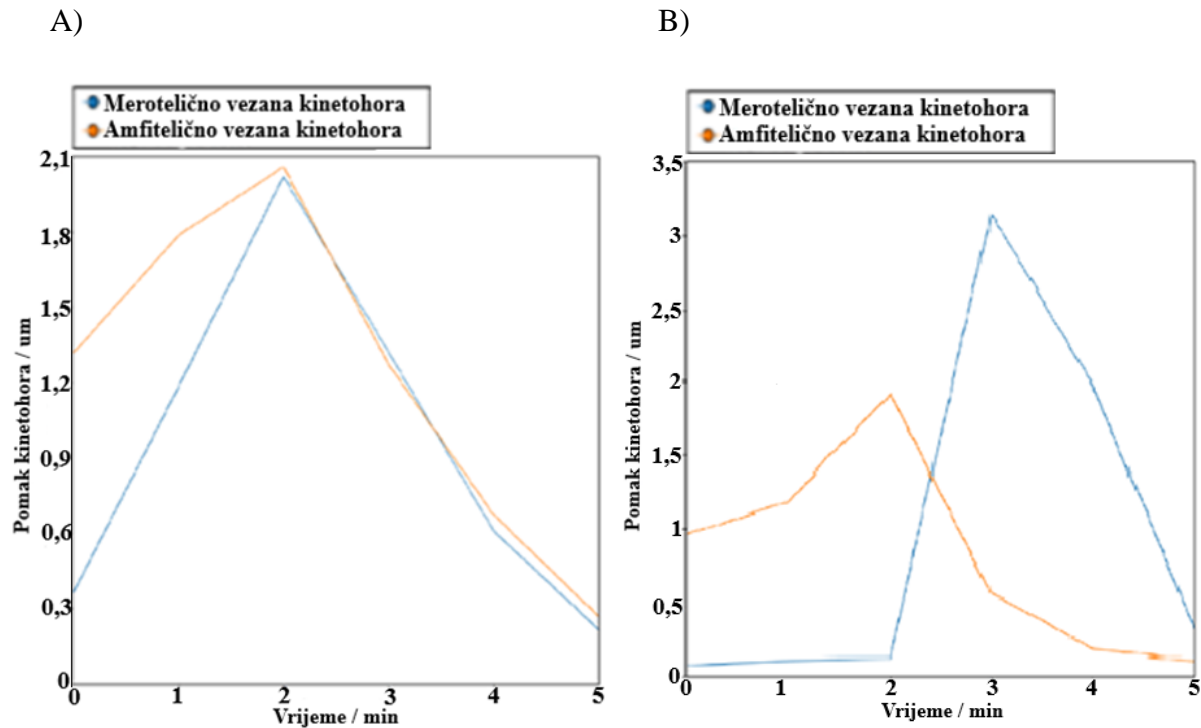
Slika 42. Merotelično vezane kinetohore kreću se ubrzano gibati tek nekoliko minuta nakon početka anafaze. Izmjeren je pomak kinetohora u odnosu na njihovu prethodnu poziciju u diobenom vretenu u vremenskom intervalu od jedne minute. Ukoliko u stanici postoje merotelično orijentirane kinetohore (plavo), njihovo gibanje u početku anafaze nije veliko. Tek nekoliko minuta nakon početka anafaze one se kreću gibati s ekvatorijalne ravnine stanice i to u većem pomaku nego amfitelično vezane kinetohore (narančasto). Primjeri A do F predstavljaju gibanja kinetohora u pojedinačnim stanicama. Vrijeme 0 označava početak anafaze. A, B, C, D, E i F predstavljaju zasebne stanice.



Slika 43. Maksimalna brzina merotelično vezanih kinetohora tijekom anafaze veća je od maksimalne brzine amfitelično vezanih kinetohora. Jednom kad se merotelično orijentirane kinetohore počnu gibati prema jednom od polova diobenog vretena, njihova je brzina u stanici značajno veća ($p=0,01$) od brzine amfitelično vezanih kinetohora. Isprekidana linija označava srednju vrijednost. Romb iscrtan isprekidanom linijom označava standardnu devijaciju. Puna linija u kvadratu označava medija, a kvadrat označava prvi i treći kvartil. Svaka boja točkice predstavlja zasebnu stanicu.

4.5.2. Merotelično vezane kinetohore stanične linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP se počinju gibati tek nekoliko minuta nakon početka anafaze.

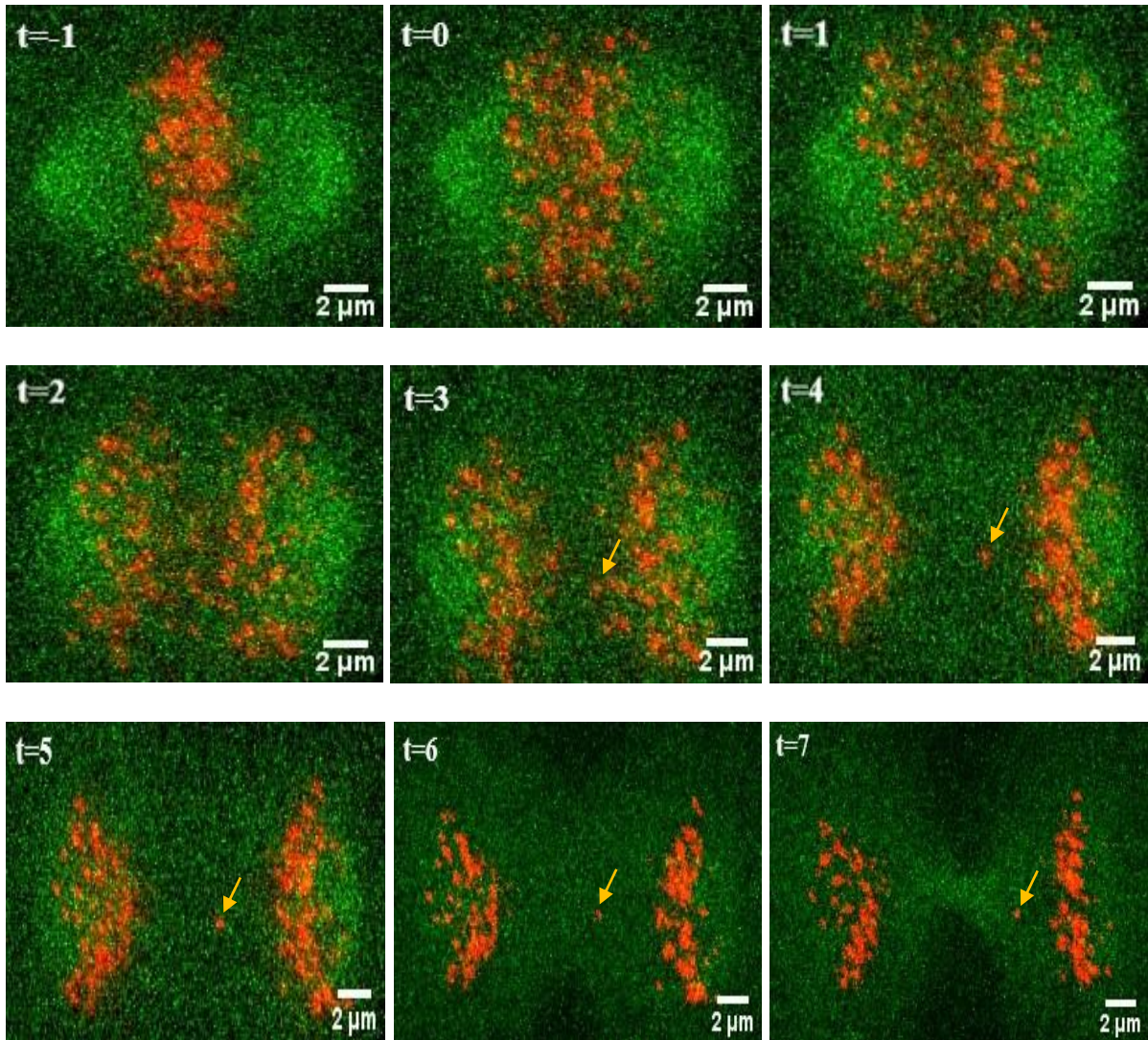
Kretanje merotelično orijentiranih kinetohora u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP počinje tek nekoliko minuta nakon početka anafaze. S obzirom da su od ukupno 103 stanice RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP snimljene samo dvije stanice s merotelično vezanim kinetohorama, ne mogu se donijeti precizni zaključci. Brzine kretanja merotelično orijentiranih kinetohora neznatno su različite od brzina amfitelično vezanih kinetohora za stanicu A, ali pokazuju slično kretanje kao stanična linija U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin za stanicu B (slika 44).



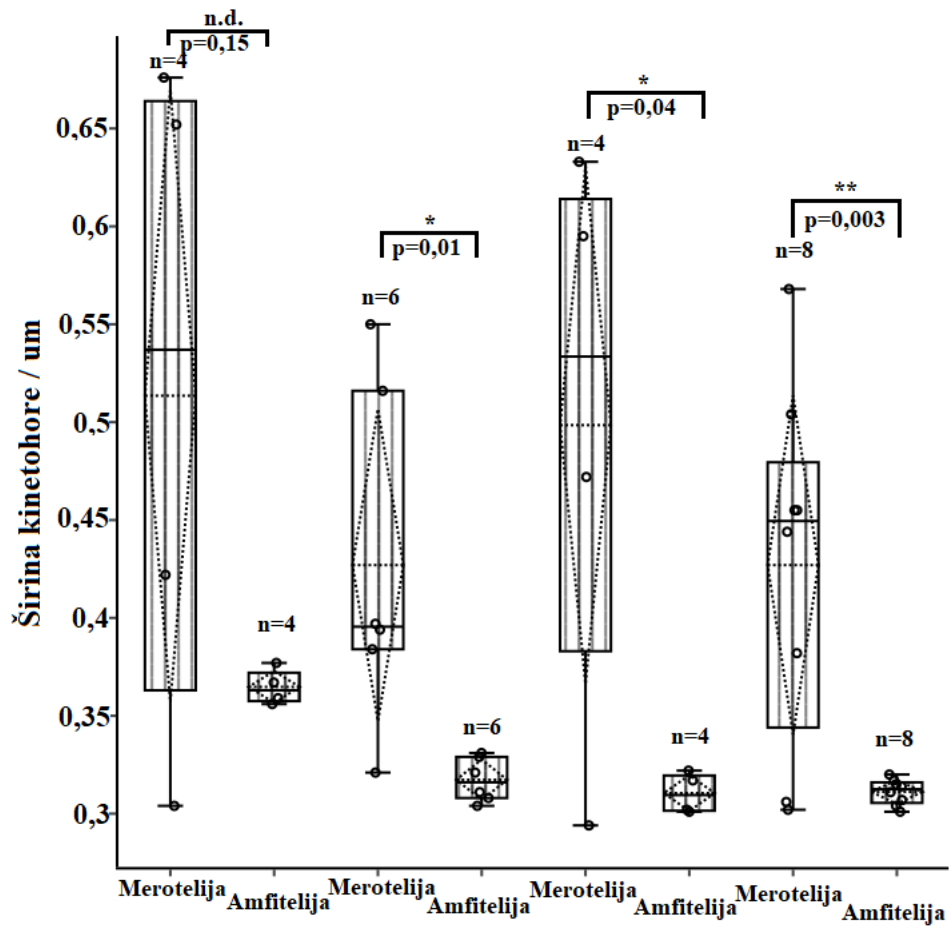
Slika 44. Merotelično vezane kinetohore kreću se ubrzano gibati tek nekoliko minuta nakon početka anafaze. Izmjeren je pomak kinetohora u odnosu na njihovu prethodnu poziciju u diobenom vretenu u vremenskom intervalu od jedne minute. Merotelično vezane kinetohore (plavo) u stanicama RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP počinju se gibati nekoliko minuta nakon amfitelično vezanih kinetohora (narančasto). Vrijeme (t) 0 označava početak anafaze. Primjeri A i B predstavljaju zasebne stanice.

4.6. Merotelično vezane kinetohore stanične linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin šire su od amfitelično vezanih uslijed potezanja mikrotubula s oba pola diobenog vretena

Mjerenjem širine merotelično vezanih kinetohora ($0,463 \pm 0,025 \mu\text{m}$, slika 45) utvrđeno je da su one značajno šire ($p < 0,001$) od amfitelično vezanih kinetohora ($0,323 \pm 0,005$; slika 46) u staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin. Lateralno su izdužene i više nalikuju elipsi od amfitelično vezanih kinetohora. Kada su merotelično vezane kinetohore približe polu poprime okrugli izgled amfitelično vezanih kinetohora.



Slika 45. Praćenje širine merotelično vezane kinetohore. Merotelično vezane kinetohore (žuta strelica) praćene su nakon početka anafaze ($t=0$) te je karakteriziran njihov oblik i širina. Prikazana je prva stanica sa slike 46.



Slika 46. Širina merotelično i amfitelično vezanih kinetohora. Merotelično vezane kinetohore (merotelija) pokazuju u tri od četiri stanice linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin značajno veću širinu od amfitelično vezanih kinetohora (amfitelija). Svaki par merotelija i amfitelija predstavlja podatke iz zasebne stanice. Romb iscrtan isprekidanom linijom označava standardnu devijaciju. Puna linija u kvadratu označava medija, a kvadrat označava prvi i treći kvartil.

5) Rasprava

Stanična linija U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin predstavlja tumorsku staničnu liniju, dok je stanična linija RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP netumorska. Rezultati ovog istraživanja o učestalosti pogreška u staničnoj diobi u skladu su s poznatim činjenicama o nestabilnost tumorskih staničnih linija i njihovoj sklonosti ka kromosomskoj nestabilnosti te akumuliranju kromosomskih strukturnih i brojčanih aberacija, između ostalog i aneuploidiji (Rutledge i Cimini, 2016). Netumorska stanična linija ipak ima manju stopu pogrešnih segregacija kromosoma jer je njezin genom u početku manje nestabilan i sklon pogreškama. Za organizam je izuzetno bitno da zdrave stanice ne podliježu često greškama koje bi vodile do aneuploidije jer bi to narušilo homeostazu cijelog organizma (Santaguida i sur., 2017). U staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP jedna se stanica nije podijelila, no vjerojatan uzrok tome je preveliko foto-oštećenje koje je uzrokovalo smrt stanice. Ukoliko su stanice snimane pod prejakim postavkama kao što je npr. prejaki laser, nerijetko je oštećenje preveliko da stanica preživi i nastavi se dijeliti (Frigault i sur., 2009).

U staničnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin uočena je aneuploidija izazvana monoorijentiranim kromosomima. U većini slučajeva mitotska kontrolna točka prepoznaje takve kromosome i odgađa početak anafaze (Cimini i Degrassi, 2005). U ovom istraživanju takve stanice su također imale produženo trajanje metafaze, no nakon nekog vremena stanice su se ipak podijelile. Dosad u literaturi nije pokazano da se tumorska ili netumorska stanica podijelila uz prisutnost monoorijentiranih kromosoma, osim ukoliko je bila tretirana nekim reagensom poput inhibitora centromernog proteina CENP-E. Taj protein je zadužen za kongresiju kromosoma na ekvatorijalnu ravninu pa je njegovim utišavanjem očekivano povećana stopa monoorijentiranih kromosoma. No, i u tom slučaju veliki dio stanica linije U2OS s inhibiranim CENP-E proteinom nije ulazilo u anafazu (Barišić i sur., 2015), dok je ovo istraživanje pokazalo da sve stanice linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin ulaze u anafazu, u odsutnosti bilo kakvog tretmana te neovisno o pogrešnom vezanju jednog ili više kromosoma. Pogrešna segregacija monoorijentiranih kromosoma bila je izazvana i citohalazinom B, staničnim mikotoksinom u ljudskim fibroblastima (Cimini, Tanzarella i Degrassi, 1999). Isti fenotip bio je pokazan i nakon tretmana ljudskih limfocita albendazolom – benzimidazol karbamatom koji se koristi kao lijek za liječenje nekoliko bolesti čovjeka. Ovaj spoj ima visoki afinitet za mikrotubule pa sprečava njihovu polimerizaciju (Ramirez, Eastmond i Herrera, 2006). U istraživanju koje su proveli Ramirez i suradnici stanice nisu bile snimane tijekom vremena diobe, već su prilikom analize bile fiksirane te su bile

analizirane metodom fluorescencijske hibridizacije *in situ*. Osim u istraživanjima gdje su stanice snimane u stvarnom vremenu, mogućnost grešaka izazvanih monoorijentiranim kromosomima bila je pokazana i u istraživanjima na netretiranim humanim limfocitima u kojima su se greške dokazivale metodom fluorescencijske hibridizacije *in situ* (Catalan i sur., 2000). Problem analize ovom metodom su česti artefakti u stanicama koji se mogu pogrešno protumačiti kao signali koji odgovaraju signalima kromosoma (Knouse, 2014). Stoga monoorijentirani kromosomi dosad nisu u literaturi opisani kao izvor aneuploidije.

Jedan od mogućih razloga za diobu uz prisutne monoorijentirane kromosome jest utišavanje mitotske kontrolne točke, tj. prestanak njezinog rada. Postoji mogućnost da je nakon nekog vremena odgode stanične diobe, stanica pronašla način da zaobiđe mitotsku kontrolnu točku i uđe u anafazu. S obzirom da je ovaj tip pogrešne segregacije uočen samo u tumorskoj staničnoj liniji, moguće je da postoji mutacija u nekoj od komponenti mitotske kontrolne točke koja onda dozvoljava da se stanice podijele iako svi kromosomi nisu amfitelično vezani na mikrotubule diobenog vretena. Ovakva bi istraživanja trebalo provesti i u drugim tumorskim i netumorskim staničnim linijama kako bi se isključila mogućnost da se radi o specifičnoj mutaciji mitotske kontrolne točke stanične linije U2OS.

Još uvijek nije potpuno razjašnjeno je li za utišavanje i izbjegavanje mitotske kontrolne točke bitnija tenzija koju „osjećaju“ ispravno vezane kinetohore (Nezi i Musacchio, 2009), samo vezanje kinetohora na mikrotubule diobenog vretena, pa čak i ono pogrešno (Etemad i sur., 2015) ili je potrebno oboje (Zhou, Yao i Joshi, 2002) kako bi se mitotska kontrolna točka utišala i stanica podijelila.

Rezolucija korištenog mikroskopa nije dovoljna da bi se vidjela pojedinačna vezanja mikrotubula na kinetohore, no upotrebom superrezolucijskog mikroskopa moglo bi se točno utvrditi jesu li obje kinetohore spojene na isti pol ili je samo jedna kinetohora u paru spojena mikrotubulima na pol diobenog vretena. To bi dalo bolji uvid u problem je li za utišavanje mitotske kontrolne točke potrebno ispravno vezanje mikrotubula na kinetohore i/ili ispravna tenzija. U nedostatku superrezolucijskog mikroskopa, u ovom istraživanju razliku između monoteličnog i sinteličnog vezanja mikrotubula na kromosome označava kut između pola diobenog vretena i monoorijentiranog para kinetohora. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da su sve stanice u minuti prije anafaze imale monotelično vezane kinetohore, no tijekom metafaze su se dinamično izmjenjivala stanja monotelije i sintelije. S obzirom na ovaj rezultat, vjerojatnije je da je stanica pronašla način da izbjegne mehanizam mitotske kontrolne točke, nego da je on utišan zbog vezanja mikrotubula na obje kinetohore.

U prilog tome da je izbjegnuta mehanizam mitotske kontrolne točke ide i rezultat koji pokazuje da se u stanicama koje imaju aneuploidiju izazvanu monoorijentiranim kromosomima, nekoliko minuta prije anafaze, sestrinske kromatide monoorijentiranog kromosoma počinju razdvajati. Dosadašnja istraživanja nisu to pokazala, a rezultat dobiven ovim istraživanjem sugerira da je enzim separaza počeo djelovati i odvajati sestrinske kromatide. U prilog tome ide podatak da je već ranije opisano kako anafaza započinje nekoliko minuta nakon utišavanja mitotske kontrolne točke (Sacristian i Kops, 2014). S obzirom da monoorijentirani kromosomi nisu ispravno vezani na mikrotubule oba pola diobenog vretena, ne postoji nikakva sila koja bi održala interkinetohornu udaljenost konstantnom nakon djelovanja separaze. U ovom je istraživanju prvi puta izmjereno kako se zbog toga njihova interkinetohorna udaljenost mijenja tijekom metafaze. Utišavanjem mitotske kontrolne točke sekurin se miče sa separaze koja onda može nesmetano odvajati sestrinske kromatide (Foley i Kapoor, 2013).

Dosadašnjim istraživanjima još nije pokazano da stanice koje ispravno segregiraju svoj genetički materijal ili imaju meroteličnu orijentaciju nekih kinetohora, ali su tijekom metafaze imale prisutne monoorijentirane kromosome blizu polova, također imaju odgođenu anafazu. U tom slučaju mitotska kontrolna točka je također odgađala početak anafaze (Cimini i Degrassi, 2005), ali u trenutku kada su se vezanja kinetohora na mikrotubule ispravila, mitotska kontrolna točka je utišana i time je omogućen početak anafaze (Musacchio i Salmon, 2007). Ovisno o tome koliko je brzo ispravljeno pogrešno vezanje kinetohora na mikrotubule, početak anafaze kreće prije ili kasnije ako ispravljanje pogrešnih orijentacija traje dugo. U prilog tome govore rezultati dobiveni ovim istraživanjem koji pokazuju da interkinetohorna udaljenost monoorijentiranih kromosoma varira jer nisu ispravno vezani na mikrotubule s oba pola diobenog vretena. Međutim, u trenutku kad se uspostavi ispravno, amfitelično vezanje kinetohora na mikrotubule, interkinetohorna udaljenost tog para kinetohora se ujednačava s prosječnom d_{KC} vrijednosti amfitelično vezanih kromosoma. U tom trenutku, mitotska kontrolna točka se utišava te nekoliko minuta nakon toga stanica kreće u anafazu (Cimini i Degrassi, 2005).

U skladu s literaturnim podacima, stanična linija U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin ima dulje prosječno trajanje mitoze od stanične linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP (Brito i Rieder, 2009). S obzirom da mitotska kontrolna točka ne prepoznaje merotelično vezane kinetohore, u stanicama s tako vezanim kinetohorima ne dolazi do odgođe anafaze, već su vremena vrlo slična stanicama s amfiteličnom orijentacijom kromosoma. Ovakvim načinom snimanja nije moguće zaključiti je li merotelična orijentacija kromosoma izazvala aneuploidiju.

To bi se moglo pokazati fotoaktivacijom sestrinskog para kinetohora, od kojeg je barem jedna kinetohora merotelično vezana te praćenjem njihove segregacije tijekom anafaze.

Tijekom istraživanja snimane su dvije stanice linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin čiji su se kromosomi u nekoliko navrata približavali polu diobenog vretena i ekvatorijalnoj ravnini (slika 34). Te dvije stanice predstavljaju dva različita slučaja jer u stanici A dolazi do popravka pogrešnih vezanja mikrotubula na kinetohore, dok stanica B naposljetku ulazi u anafazu, iako svi kromosomi nisu amfitelično vezani na mikrotubule diobenog vretena. Slučajevi poput ovih dovode u pitanje ispravnost segregacije kromosoma u stanicama koje su u metafazi imale prisutne monoorijentirane kromosome. Prema ovim podacima je vidljivo da čak i kromosomi koji se nalaze u ekvatorijalnoj ravnini stanice ne moraju nužno imati uspostavljenu ispravnu, amfiteličnu orijentaciju. Bolji način praćenja takvih parova kinetohora i nakon anafaze bilo bi fotoaktivirati ih kad se nalaze blizu pola. U tom slučaju točno bi se pratilo kako se kreću kinetohore od interesa.

Primijećeno kretanje merotelično vezanih kinetohora uzrokovano je vezanjem kinetohora na oba pola diobenog vretena. S obzirom da je kinetohora vezana snopovima mikrotubula na suprotne strane stanice, početkom anafaze ona „osjeća“ privlačne sile s oba pola diobenog vretena (Cimini, 2008). Stoga se nekoliko minuta nakon početka anafaze ta kinetohora kreće oko ekvatorijalne ravnine u malim pomacima. Kada prevlada privlačna sila snopa mikrotubula s jedne strane, oni brzo povuku tu kinetohoru prema svom polu diobenog vretena. Zbog tog povlačenja kinetohora s oba pola diobenog vretena kinetohore postaju izdužene, tj. njihova je širina veća što je vidljivo na slici 45. Taj je rezultat očekivan jer je isto ranije pokazano u stanicama bubrega klokan Ptk1 (Cojoc i sur., 2016). Isti fenotip nije zabilježen u staničnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP (4.4.2.), no snimljene su samo dvije stanice koje su pokazivale merotelično vezanje kinetohora. Te stanice su pokazivale kontradiktorno ponašanje stoga se ne može izvesti nikakav konačni zaključak.

6) Zaključak

U ovom istraživanju praćena je stanićna dioba tumorskih stanica linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin i netumorskih stanica linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP u vremenu. U stanićnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin uoćena je veća stopa pogrešnih segregacija kromosoma nego u stanićnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP što je posljedica nestabilnosti genoma tumorskih stanica, koji vodi kromosomskim aberacijama, posebice aneuploidiji. Najveći broj grešaka u stanićnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin uzrokovan je merotelićno vezanim kinetohorama, dok je u stanićnoj liniji RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP zabilježen kromosomski most kao dominantna vrsta greške. Te vrste grešaka ne prepoznaje mitotska kontrolna toćka te je stoga povećana vjerojatnost da će one ostati neispravljene do poćetka anafaze.

Nadalje, u ovom istraživanju pokazano je da se u stanićnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin stanice dijele i uz prisutnost monoorijentiranih kromosoma što je znak da je mitotska kontrolna toćka prerano utišana ili je neispravno radila svoj posao. Te monoorijentirane kinetohore pokazuju veću varijabilnost u interkinetohornoj udaljenosti od amfitelićno vezanih kinetohora što je posljedica neispravne i neravnomjerne tenzije uslijed pogrešnog vezanja kromosoma.

Gibanje merotelićno vezanih kinetohora usporeno je nekoliko minuta nakon poćetka anafaze nakon ćega se te kinetohore poćinju ubrzano kretati. Nakon poćetnog potezanja kinetohore od strane snopova mikrotubula na oba pola diobenog vretena, jedan snop mikrotubula konaćno jaćom silom poteže kinetohoru prema svom polu diobenog vretena. U stanićnoj liniji U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin brzina kretanja merotelićno orijentiranih kinetohora znaćajno je veća od brzine kretanja amfitelićno vezanih kinetohora.

7) Literatura

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007): Molecular biology of the cell, Fifth Edition, New York, Garland Science.

Amon A. (1999): The spindle checkpoint. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 69-75.

Baker D. J., van Deursen J. M. (2010): Chromosome missegregation causes colon cancer by APC loss of heterozygosity. *Cell Cycle*. **9**: 1711-1716.

Barišić M., Silva e Sousa R., Tripathy S. K., Magiera M. M., Zaytsev A. V., Pereira A. L., Janke C., Grishcuk E. L., Maiato H. (2015): Microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science*. **348**: 799-803.

Brito D. A., Rieder C. L. (2008): The ability to survive mitosis in the presence of microtubule poisons differs significantly between human nontransformed (RPE-1) and cancer (U2OS, HeLa) cells. *Cytoskeleton*. **66**: 437-447.

Catalan J., Surralles J., Falck G. C., Autio K., Norppa H. (2000): Segregation of sex chromosomes in human lymphocytes. *Mutagenesis*. **15**: 251-255.

Cimini D. (2008): Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim Biophys Acta*. **1786**: 32-40.

Cimini D., Degrossi F. (2005): Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends Cell Biol.* **15**: 442-451.

Cimini D., Tanzarella C., Degrossi F. (1999): Differences in malsegregation rates obtained by scoring ana-telophases or binucleate cells. *Mutagenesis*. **6**: 563-568.

Cojoc G., Roscioli E., Zhang L., Garcia-Ulloas A., Shah J. V., Berns M. W., Pavin N., Cimini D., Tolić I. M., Gregan J. (2016): Laser microsurgery reveals conserved viscoelastic behavior of the kinetochore. *J. Cell Biol.* **212**: 767-776.

Compton D. A. (2011): Mechanisms of aneuploidy. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **23**: 109-113.

Cooper G. M., Hausman R. E. (2004): Stanica: molekularni pristup, Treće Izdanje, Zagreb, Medicinska naknada.

- Etemad B., Vertesy A., Kuijt T. E. F., Sacristian C., van Oudenaarden, Kops G. J. P. L. (2019): Spindle checkpoint silencing at kinetochores with submaximal microtubule occupancy. *J. Cell Sci.* **132**: 1-11.
- Etemad B., Kuijt T. E. F., Kops G. J. P. L. (2015): Kinetochore–microtubule attachment is sufficient to satisfy the human spindle assembly checkpoint. *Nat. Commun.* **6**: 8987.
- Frigault M. M., Lacoste J., Swift J. L., Brown C. M. (2009): Live-cell microscopy – tips and tools. *J. Cell Sci.* **122**: 753-767.
- Kajtez J., Solomatina A., Novak M., Polak B., Vukušić K., Rudiger J., Cojoc G., Milas A., Šumanovac Šestak I., Risteski P., Tavano F., Klemm A. H., Roscioli E., Welburn J., Cimini D., Glunčić M., Pavin N., Tolić I. M. (2016): Overlap microtubules link sister k-fibers and balance the forces on bi-oriented kinetochores. *Nat. Commun.* **7**: 10298-10312.
- Knouse K. A., Wu J., Whittaker C. A., Amon A. (2014): Single cell sequencing reveals low levels of aneuploidy across mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**: 13409-13414.
- Knouse K. A., Lopez K. E., Bachofner M., Amon A. (2018): Chromosome Segregation Fidelity in Epithelia Requires Tissue Architecture. *Cell.* **175**: 200-211.
- Kuhn J., Dumont S. (2018): Mammalian kinetochores count attached microtubules in a sensitive and switch-like manner to control cell cycle progression. *BioRxiv*.
- Loodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H. (2008): *Molecular cell biology*, Sixth Edition, New York, W. H. Freeman and company.
- Musacchio A., Salmon E. D. (2007): The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 379-393.
- Nezi L., Musacchio A. (2009): Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 785-795.
- Pampalona J., Roscioli E., Silkworth W. T., Bowden B., Genesca A., Tusell L., Cimini D. (2016): Chromosome bridges maintain kinetochore-microtubule attachment throughout mitosis and rarely break during anaphase. *Plos One.* **11**: e0147420.
- Pinsky B. A., Biggins S. (2005): The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol.* **15**: 486-493.

Ramirez T., Eastmond D. A., Herrera L. A. (2006): Non-disjunction events induced by albendazole in human cells. *Mutat. Res.* **626**: 191-195.

Rutledge S. D., Cimini D. (2016): Consequences of aneuploidy in sickness and in health. *Curr. Opin. Cell Biol.* **40**: 41-46.

Sacristian C., Kops G. J. P. L. (2014): Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Trends Cell Biol.* **25**: 1-8.

Santaguida S., Richardson A., Ramalingam Iyer D., Rhind N., Desai A., Amon A. (2017): Chromosome mis-segregation generates cell-cycle-arrested cells with complex karyotypes that are eliminated by immune system. *Dev. Cell.* **41**: 638-651.

Tolić I. M. (2018): Mitotic spindle: Kinetochores hold on tight to interpolar bundles. *Eur. Biophys. J.* **47**: 191-203.

Vleugel M., Hoogendoorn E., Snel B., Kops G. J. P. L. (2012): Evolution and function of the mitotic checkpoint. *Dev. Cell.* **23**: 239-250.

Zhou J., Yao J., Joshi H. C. (2002): Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Sci.* **115**: 3547-3555.

Zahvale

Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivi Tolić na ukazanom povjerenju. Hvala na svim prilikama i pomoći pri svladavanju svih problema. Vaš pozitivni stav i entuzijazma prema znanosti, nepresušan su mi izvor motivacije za nastavak rada i želje za napretkom.

Hvala Patriku na strpljenju pri svladavanju prvih koraka u laboratoriju. Hvala na konstruktivnim savjetima i raspravama te svojoj pomoći u laboratoriju.

Hvala prof.dr.sc. Vlatki Zoldoš na svom prenesenom znanju i ukazivanju na to kakva bi znanost trebala biti.

Hvala svim ostalim članovima grupe Tolić na ugodnoj radnoj atmosferi, na svim diskusijama kako o znanosti, tako i o životu. Hvala Sonji na pomoći pri snalaženju u laboratoriju i svoj potpori kada eksperimenti nisu funkcionirali. Hvala Ivani Š. što mi je tijekom boravka u laboratoriju bila i mama i psiholog, hvala na svojoj brizi i pomoći, na svim ispijenim ranojutarnjim kavama i dadiljanjima prije 7 sati ujutro.

Hvala izv. prof. dr. sc. Nenadu Pavinu i svim teoretičarima na svim znanstvenim savjetima.

Hvala svim prijateljima na razumijevanju što vikendi više nisu za kave i druženja, hvala za potporu i sve prilagodbe mom rasporedu.

Hvala Jurici na svakom ohrabrivanju, na svakom savjetu i tješnju. Hvala što si sa mnom dijelio sreću svakog uspjeha, ali i suze nakon svakog neuspjeha. Hvala što mi nikad nisi dao da odustanem, čak ni kad se meni to činilo kao jedino rješenje.

Za kraj, hvala Josipu, Verici, mami i tati. Hvala što ste uvijek prepoznali sve moje potencijale, hvala što ste me podržavali u svakoj želji i naumu, iako ih ponekad niste razumijeli. Hvala što uvijek vjerujete u mene, brinete se i razumijete čak ni kad mjesec dana ne stignem doći doma.



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Sažetak

Učestalost aneuploidije u tumorskim i netumorskim stanicama te određivanje osnovnih pogrešaka pri segregaciji kromosoma

Snježana Kodba

Pravilan razvoj svih živih organizama ovisi o ispravnosti stanične diobe. Pogrešna segregacija genetičkog materijala tijekom stanične diobe može imati teške do letalne posljedice za stanicu, ali i cijeli organizam. Kromosomsko stanje koje nastaje zbog pogrešne segregacije kromosoma naziva se aneuploidija. Mehanizam kojim nastaje aneuploidija te način na koji ju stanica propagira još uvijek nisu posve razjašnjeni. Različite stanične linije imaju različite stope pogrešaka pri segregaciji kromosoma. Tu se ističu tumorske stanice koje se često mogu nesmetano dijeliti usprkos kromosomskoj nestabilnosti. U ovom istraživanju analizirana je razlika učestalosti aneuploidije između ljudskih tumorskih stanica linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin i netumorskih stanica linije RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP. Korištenjem fluorescentno obilježenih proteina praćeno je kretanje kinetohora u vremenu te je analizirano trajanje stanične diobe. Detaljnije su opisane pojedinačne specifične pogreške. Stopa pogrešaka u tumorskim stanicama U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin veća je nego u netumorskim stanicama RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP. Najučestalije su pogreške koje uspješno izbjegavaju mitotsku kontrolnu točku u obje stanične linije, a to su merotelično vezane kinetohore i kromosomski mostovi. Novi rezultat proizašao iz ovog istraživanja, a koji nije prethodno opisan u literaturi, je da u stanicama linije U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin monoorijentirani kromosomi također uzrokuju aneuploidiju. Njihova interkinetohorna udaljenost je varijabilna te se naglo povećava neposredno prije početka anafaze zbog utišavanja mitotske kontrolne točke. Merotelično vezane kinetohore počinju se brzo gibati tek nekoliko minuta nakon početka anafaze.

Ključne riječi: aneuploidija, kromosomska nestabilnost, monotelično vezanje, merotelično vezanje, amfitelično vezanje, kromosomski most, mitotska kontrolna točka



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Abstract

Aneuploidy incidence in tumor and non-tumor cells and
characterization of primary segregation errors

Snježana Kodba

Normal development of all living organisms depends on proper cell division. Erroneous chromosome segregation during cell division can have severe consequences or even be lethal for cells and whole organisms. Condition caused by segregation errors is called aneuploidy. Mechanism by which aneuploidy arises and survives in the cell is still not known. Different cell lines experience diverse frequency of segregation errors. Tumor cells are well known as cells which can propagate aneuploidy and chromosomal instability. The goal of this experiment was to analyze different frequencies of aneuploidy between tumor cell line U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin and non-tumor cell line RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP. Movement of kinetochores in time was traced by using fluorescently labeled proteins. Also, from that data it was estimated the time which it takes for cell to divide. Frequency of segregation errors is higher in tumor cell line U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin than in non-tumor cell line RPE1 CENP-A-GFP Centrin1-GFP. Most frequent type of errors in both cell lines are those who can escape spindle assembly checkpoint, merotelic attachments and chromosome bridges. In U2OS CENP-A-GFP mCherry- α -tubulin PA-tubulin the presence of monooriented chromosomes was also detected after the anaphase onset, which was previously not shown. Their interkinetochore distance varied through metaphase and then suddenly increased just before anaphase onset, possibly because spindle assembly checkpoint was silenced. Merotelic attachments start to move fast few minutes after anaphase onset.

Key words: aneuploidy, chromosomal instability, monotelic attachment, merotelic attachment, amphitelic attachment, chromosome bridge, spindle assembly checkpoint

8) Životopis

Osobni podatci

Ime i prezime: Snježana Kodba

Datum rođenja: 15.2.1997.

Mjesto rođenja: Čakovec

Obrazovanje

2003.-2011. III. osnovna škola Čakovec

2011.-2015. Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec

2015.-2018. Preddiplomski studij Molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2018.- Diplomski studij Molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2014. Drugo mjesto na Državnom natjecanju iz biologije u kategoriji istraživačkih radova

2015. Nagrada Rotary kluba Čakovec za najbolju maturanticu generacije 2014./2015. u Međimurskoj županiji