

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ORGANIZACIJA MIKROTUBULA I DIOBENOG VRETENA U STANICAMA BEZ
CENTROSOMA

ORGANISATION OF MICROTUBULES AND SPINDLE POLE IN THE CELLS
WITHOUT CENTOSOMES

SEMINARSKI RAD

Mirjana Polovi
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate study of molecular biology)
Mentor: doc. dr. sc. Dunja Leljak–Levani

Zagreb, 2010.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. BILJNE ACENTROSOMALNE STANICE	3
2.1. Mikrotubuli	3
2.1.1. Dinamika mikrotubula	4
2.1.1.1. Važnost dinamike mikrotubula u mitozu	5
2.1.2. Mjesto nukleacije mikrotubula	7
2.1.3. Korištenje fluorescentnog proteina u istraživanju mjesta sastavljanja mikrotubula	8
2.2. Gama tubulin	8
2.2.1. Eksperimentalni dokazi gama tubulina	9
2.3. Proteini pridruženi mikrotubulima	11
2.4. Biljni motor proteini	11
2.5. Kontrola nukleacije	12
2.6. Biljni mutanti sa defektom u sastavljanju diobenog vretena	12
2.7. Središta organizacije mikrotubula	13
3. USPOREDBA BILJNIH STANICA SA ŽIVOTINJSKIM STANICAMA	14
3.1. Gama tubulinski kompleksi kod životinjskih stanica	14
3.2. Sekundarna središta organizacije mikrotubula kod centrosomalnih stanica	15
3.3. Nastanak diobenog vretena posredstvom kromosoma	16
4. LITERATURA	17
5. SAŽETAK	18
6. SUMMARY	18

1. UVOD

Mitoza je stani na dioba kojom iz jedne stanice nastaju dvije geneti ki identi ne stanice. Kod biljnih stanica dioba završava umetanjem nove stijenke između u budu ih stanica k eri dok se životinjska stanica cijepa na dvije.

Kod ve ine životinjskih stanica kao središta organizacije mikrotubula postoje centrosomi iz kojih se odvajaju mikrotubulski filament i tvore diobeno vreteno. Me utim, uklanjanjem centrosoma mikrooperacijom ili laserom mogu je nastanak diobenog vretena. Kod biljaka se, tako er u odsutnosti centrosoma, mikrotubuli pravilno slože u diobeno vreteno (Lüders and Stearns, 2007). Gubitkom stani ne mobilnosti tijekom evolucije, u stanicama viših biljaka centrosomi su nestali u svim stadijima stani nog ciklusa i razvoja. U potpunosti im nedostaju centrioli, a ipak se bipolarno diobeno vreteno pravilno složi. Iz toga se zaklju uje da centrioli nisu neophodni u organizaciji citoskeleta. Dvije glavne hipoteze pretpostavljaju:

- a) višestruka središta odgovorna za slaganje i organizaciju mikrotubula i
- b) stvaranje mikrotubula na jednom mjestu, na površini stanice, a odvojeno njihovu organizaciju.

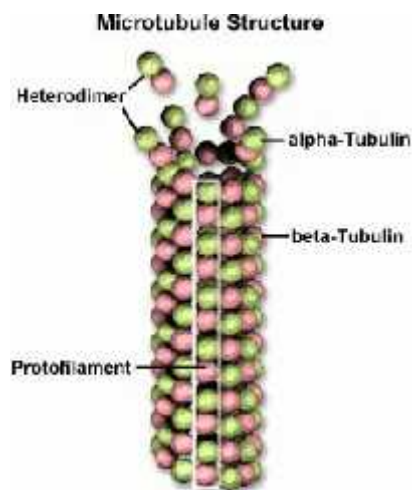
Kod viših biljaka svaki snop mikrotubula (kortikalni i citoplazmatski) ima druga iju orijentaciju. To ukazuje na višestruka i precizno locirana mjesta sastavljanja mikrotubula, što je u skladu sa prvom hipotezom. U skladu s drugom hipotezom, stvaranje mikrotubula i njihova prostorna organizacija su dva ovisna procesa koja se doga aju u razli ito vrijeme pod razli itim kontrolama. Nadalje, ukoliko postoji jedinstveno i centralno mjesto organizacije mikrotubula, trebali bi postojati specifi ni mehanizmi za orijentaciju mikrotubula i/ili premještanje mikrotubula u stani nu stijenku.

Za mikrotubule su vezani razli iti proteini zvani MAPs (od engleskog: Microtubule Associated Proteins). Oni štite mikrotubule od raspada i stabiliziraju ih. Ti proteini su motor proteini (dinein, kinezin) te proteini koji sudjeluju u organizaciji mikrotubula. Od ovih posljednjih se najviše izdvaja gama tubulin, koji je najvažniji protein u organizaciji mikrotubula (Canaday i sur., 2000).

2. BILJNE ACENTROSOMALNE STANICE

2. 1. Mikrotubuli

Mikrotubuli su duga ka polimerna vlakna koja se protežu kroz cijelu citoplazmu, od površine jezgre do stani ne membrane. Sudjeluju u stani nim transportima, stani nim i unutarstani nim gibanjima i diobama eukariotskih stanica. Gra eni su od globularnog proteina tubulina. Taj protein je heterodimer sastavljen od dva polipeptidna lanca, alfa i beta tubulina, povezana nekovalentnim vezama. Polimerizacijom tubulinskih dimera u uzdužne nizove nastaje struktura nazvana protofilament. Pravilnom orijentacijom dimera stvaraju se mikrotubuli sa razli itom polarnosti krajeva. Svaki mikrotubul ima pozitivan kraj koji je brže rastu i od negativnog kraja. Beta tubulin je usmjeren prema plus kraju, a alfa tubulin prema minus kraju. Udruživanjem 13 linearnih protofilamenata nastaje šuplji filament mikrotubula (Slika 1.). Gama tubulin ne polimerizira sa alfa i beta tubulinom (Eckardt, 2006).



Slika 1. Struktura mikrotubula. Alfa i beta tubulin udruživanjem tvore dimer. Njihovom polimerizacijom nastaju protofilamenti, strukture koje udruživanjem daju mikrotubul.

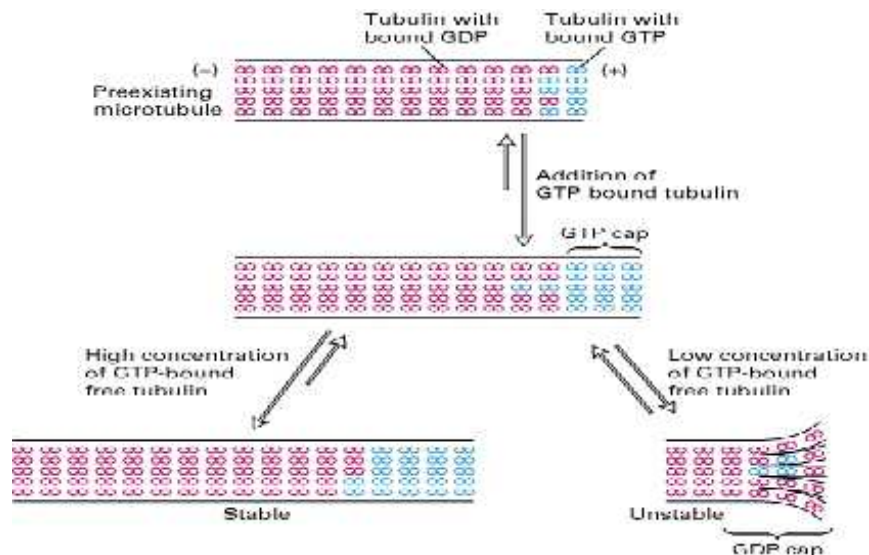
(Preuzeto sa: http://vbaulin.front.ru/research/a_microtub.html).

2.1.1. Dinamika mikrotubula

Mikrotubuli kod biljaka ine radijalne snopove povezane sa jezgrinom ovojnicom, kortikalne interfazne mikrotubule, kortikalnu preprofaznu ploču, diobeno vreteno i fragmoplast. Pokazuju visoku dinamiku nestabilnost u smislu izduživanja i kidanja strukture. Biljni su mikrotubuli dinamičniji od životinjskih te su različiti od onih u životinjskim stanicama i stanicama gljiva. Većina mikrotubula je povezana negativnim krajem za površinu jezgre, a pozitivnim krajem se izdužuju kroz citoplazmu (Canaday i sur., 2000).

Izduživanje ili kidanje mikrotubula ovisi o dva faktora. Prvi je količina slobodnog alfa i beta tubulina u stanici. Koncentracija alfa i beta tubulina koja je u ravnoteži sa mikrotubulima naziva se kritična koncentracija. Ako je količina iznad kritične, mikrotubuli će rasti, a ako je ispod kritične, dimeri tubulina disociraju sa postojećih mikrotubula. Ako je količina tubulina blizu kritične vrijednosti, neki mikrotubuli će rasti, a neki će se smanjivati. Drugi faktor je količina GTP-beta tubulina. Za alfa tubulin je također vezan GTP, ali on ne hidrolizira. Na beta tubulinu se nalazi E-mjesto (od engl. Exchangeable nucleotid-binding site) za koje se veže GTP. Vezanje dimera tubulina sa GTP na pozitivni kraj mikrotubula uvjetuje rast mikrotubula. GTP hidrolizira na GDP i takav ostaje vezan za beta tubulin, a oslobođena energija služi za dinamiku mikrotubula. Mikrotubul postaje nestabilan i počinje se kidati heterodimeri ukoliko se na samom pozitivnom kraju nalazi „kapa“ sa vezanim GDP-beta tubulinom. Takvo stanje može nastati ako mikrotubul sporo raste pa se GTP hidrolizira prije dodavanja novih GTP-beta tubulina na sam kraj ili kod brzog skraćivanja mikrotubula (Slika 2). Stopa izduživanja mikrotubula je dvaput brža na plus kraju (Preuzeto sa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5428>).

Dixit i Cyr (2004) su pokazali da kod rasta i pozitivni kraj kortikalnih mikrotubula dodirne postojeće kortikalne mikrotubule mijenja smjer kretanja ovisno o kutu pod kojim se susreću. Ako je kut dodira mali, mikrotubulski nizovi se međusobno poravnavaju i stabiliziraju. Ukoliko je kut dodira velik, potiče se depolimerizacija mikrotubula. Tako se uređuju nizovi mikrotubula (Eckardt, 2006).



Slika 2. Dinamika mikrotubula. Rast mikrotubula dodavanjem GTP-beta tubulina na pozitivni kraj mikrotubula (lijevo). Smanjenjem količine GTP-beta tubulina, na pozitivnom kraju ostaje vezan beta tubulin u kompleksu sa GDP što potiče kidanje tubulinskih dimera i skraćivanje mikrotubula (desno).

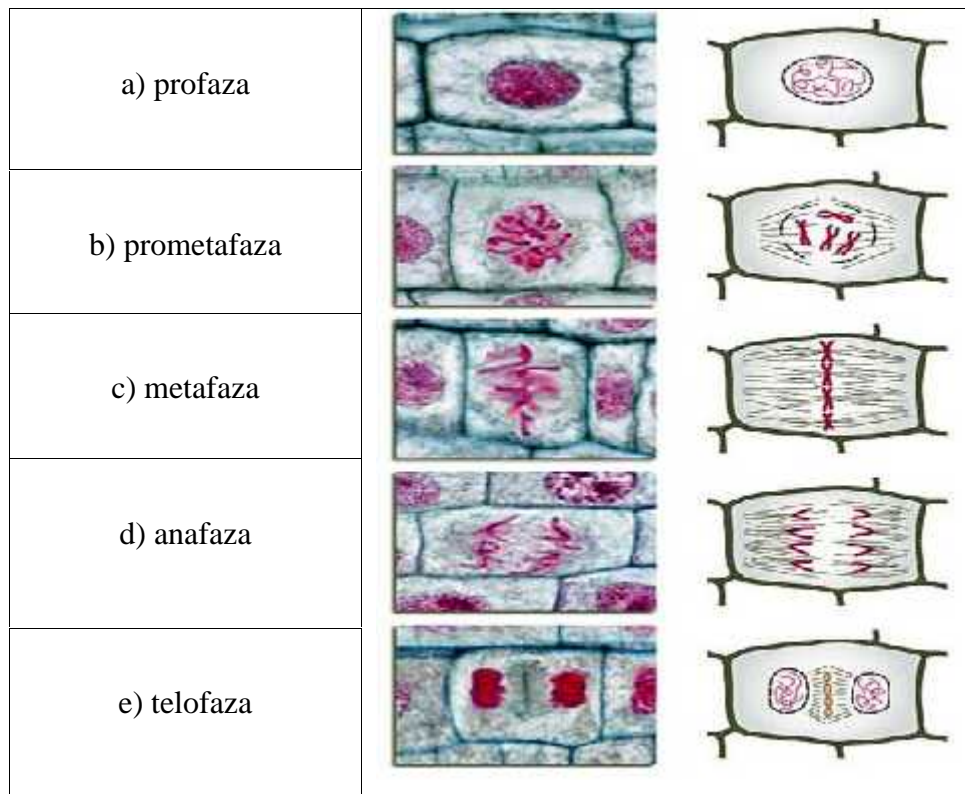
(Preuzeto sa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5428>).

2.1.1.1. Važnost dinamike mikrotubula u mitozu

Tijekom interfaze, kortikalni mikrotubuli su smješteni ispod plazma membrane. U ranoj G2 fazi, oni se razdvajaju i tvore preprofaznu vrpca. Nukleacijska aktivnost površine jezgre je najaktivnija u G2 fazi kad se mikrotubuli intenzivno sastavljaju i počinje se stvarati acentrosomalno mitotičko vreteno okomito na preprofaznu vrpca. Ti događaji prethode razgradnji jezgrine ovojnice nakon čega je stvoreno diobeno vreteno, a preprofazna vrpca nestaje. Diobeno vreteno ima raspršene polove, a nije kao kod centrosomalnih stanica organizirano na polovima. Preprofazna vrpca predstavlja mjesto na kojem se u telofazi stvara fragmoplast kao i budući u ravninu za podjelu stanice na pola tokom citokineze. U telofazi, rekonstruirana sestrinska jezgra pokazuje intenzivnu nukleaciju mikrotubula koji se izdužuju prema sredini i sudjeluju u stvaranju fragmoplasta (Slika 3).

Obilno sastavljane mikrotubula je prisutno u fragmoplastu, koji predstavlja kratkotrajno mjesto sastavljanja mikrotubula. Istraživanja Lamberta (1993) i Schmita (2000) ukazuju na uključnost proteinskih kompleksa za sastavljanje mikrotubula u fragmoplast gdje se

aktiviraju i obavljaju svoju funkciju. Mikrotubuli koji nastaju u fragmoplastu imaju polarnost suprotnu mikrotubulima koji nastaju sa površine jezgre. Uključeni su u vezikularni transport materijala za stvaranje stanične ploče i njen rast prema kortikalnom mjestu prethodno određenom preprofaznom vrpcom (Canaday i sur., 2000).



Slika 3. Mitoza kod biljnih stanica. S površine jezgre se izdužuju mikrotubuli na početku profaze. Jezgrina ovojnica se uskoro potom razgrađivati (a). Mikrotubuli se vežu za kromosome (b). Jasno se vide višestruki polovi mitotičkog vretena (c). U anafazi se odvajaju kromatide i putuju na suprotne polove stanice (d). U telofazi se stvara fragmoplast iz kojeg se izdužuju mikrotubuli koji sudjeluju u stvaranju nove stanične membrane između odvojenih setova kromosoma. Jezgrina ovojnica se ponovno stvara (e). (Preuzeto i prilagođeno prema: <http://www.life.illinois.edu/ib/102/lectures/08mit&veg102.html>).

2.1.2. Mjesto nukleacije mikrotubula

Glavno mjesto nukleacije kod biljnih stanica je površina jezgre koja posjeduje sposobnost sli nu centrosomu, odnosno, funkcionira kao središte nukleacije mikrotubula. Istraživanja o uklju enosti jezgrine ovojnice u sastavljanje i organizaciju mikrotubula zapo eli su De Mey i sur. (1982) te odvojeno Bajer i Molè-Bajer (1982) na endospermalnim stanicama vrste *Haemanthus*. Antitijela na životinjski neurotubulin reagiraju na biljni tubulin što je iskorišteno u metodi ozna avanja antitijelima uz korištenje koloidnog zlata. Metoda omogu ava preciznije pra enje promjena u mikrotubulinskom rasporedu tijekom mitoze. Fluorescentno ozna avanje antitijela na tubulin u endospermalnim stanicama vrsta *Clivia nobilis* i *Haemanthus katherinae* (istraživanja Schmita i sur.,1983) prikazuje još bolji raspored mikrotubula na po etku profaze i prijelazu iz telofaze u interfazu (Canaday i sur.,2000).

Daljnja istraživanja su nastavljena u sli nom smjeru, a od zna ajnijih je ugradnja tubulina iz vrste *Paramecium* u liziranu endospermalnu stanicu vrste *Haemanthus*. U in vitro uvjetima, doga a se kopolimerizacija tubulina iz praživotinjske stanice i stanice viših biljaka. Izvana dodani tubulin se veže za mikrotubulinske slobodne krajeve, što nakon fluorescentnog ozna avanja antitijelima na tubulin ozna ava površinu jezgre kao mjesto sastavljanja mikrotubula (Vantard i sur.,1990). Prema istraživanju Stoppina i sur. (1994), in vitro funkcijski testovi sa izoliranom biljnom jezgrom uz pro iš eni neurotubulin i bez stabiliziraju ih tvari daju dokaz da je površina jezgre biljne stanice sposobna za sastavljanje mikrotubula s koncentracijom tubulina manjom od one potrebne za samosastavljanje.

Osim površine jezgre, ostala mjesta tako er mogu sadržavati mikrotubulsku nukleacijsku aktivnost u razli itim stadijima stani nog ciklusa. Ako biljke posjeduju višestruke centre za nukleaciju mikrotubula i/ili organizaciju onda bi kortikalni mikrotubuli mogli biti nukleirani organizacijskim središtima mikrotubula prisutnim u kortikalnoj membrani. Taj mikrotubulski organizacijski centar može biti sastavljen od gama tubulinskog kompleksa koji je prvo transpotiran u korteks, a onda aktiviran. Budu i da je konfokalnim mikroskopom utvr eno da mikrotubulinski nizovi vežu površinu jezgre sa preprofaznom vrpcom, mogu e je porijeklo kortikalnih mikrotubula s površine jezgre. Preprofazna vrpca odre uje mjesto gdje e se razviti budu a stani na plo a. Predloženo je da specifi na membrana ili kortikalni proteini ostaju u tom mjestu i aktiviraju se tokom rasta stani ne plo e (Canaday i sur., 2000).

2.1.3. Korištenje fluorescentnog proteina u istraživanju mjesta sastavljanja mikrotubula

Označavanje proteina GFP-om (od engl: Green Fluorescent Protein) je važna metoda istraživanja funkcije i dinamike citoskeleta. Nema štetnog utjecaja na žive stanice i lako se detektira mikroskopom. Korištenje proteina obilježenih GFP-om je nov i moćan alat za istraživanje dinamike i funkcije citoskeleta u živim stanicama (nije potrebno mikroinjiciranje). Sastavljanje citoskeleta *in vivo*, što su istražili Ludin i Matus (1998) te istovremeno ali odvojeno Marc i sur. iste godine, pronađeno je nakon fluorescentnog obilježavanja proteina koji sudjeluju u organizaciji citoskeleta. Tom metodom je dokazan gama tubulin na površini jezgre.

Istraživanja Marshalla i suradnika (1996) na životinjskim stanicama pripomogla su u proučavanju uloge gama tubulina u organizaciji diobenog vretena. Homolog biljnog gama tubulina, Tub4p iz vrste *Saccharomyces cerevisiae* je fuzioniran sa GFP-om. Fluorescencija je lokalizirana *in vivo* u području polarnog tijela, koje je mjesto organizacije diobenog vretena kod kvasca. U vrsti *Drosophila melanogaster* fuzioniran je GFP sa kinezinom koji veže minus kraj mikrotubula. Lokaliziran je u području centrosomina i diobenom vretenu (Istražili Endow i Komma, 1997).

Proteini obilježeni GFP-om, među kojima je gama tubulin od najvećeg značaja, daju važne podatke o sastavljanju i dinamici mikrotubula (Canaday i sur., 2000).

2.2. GAMA TUBULIN

Proteini povezani sa mikrotubulima važni su jer stabiliziraju mikrotubule i štite ih od razgradnje. Također, pomažu njihovo sastavljanje na površini jezgre. Gama tubulin je nađen kod životinjskih stanica u citoplazmatskom multiproteinskom kompleksu, u gama somu ili u gama-TuRC-u (gama Tubulin Ring Complex). U biljnim stanicama prisutan je uz mikrotubule u svim stadijima staničnog ciklusa, na površini jezgre i u fragmoplastu. U *in vitro* uvjetima je dokazana nukleacijska aktivnost gama tubulina. Lokalizacijom u stanici prikazuje se da nije vezan za jedno mjesto, već je raspršen duž snopova mikrotubula. To je u skladu sa pretpostavkom da se nukleacija mikrotubula događa na višestrukim mjestima, a ne na jednom mjestu u stanici. Za nukleaciju mikrotubula potrebna je prisutnost gama tubulina i ve postoje ih mikrotubula. Gama tubulin je povezan i sa svim necentrosomalnim

mikrotubulinskim organizacijskim centrima i u njegovoj odsutnosti ti organizacijski centri nisu u mogućnosti sastaviti i organizirati mikrotubule.

Označavanje gama tubulina ne mora nužno odgovarati mjestu nukleacije jer antitijela mogu označavati aktivan i inaktivan protein. Isprekidan uzorak gama tubulina duž mikrotubula, otkrivenog imunofluorescencijom ili korištenjem koloidnog zlata, pokazuje na perimikrotubularan razmještaj i ukazuje kako on nije sastojak mikrotubulske mreže. Može se da se neaktivni gama tubulin prenosi duž mikrotubula do mjesta nukleacije, odnosno do negativnog kraja mikrotubula.

Cijeli slijed cDNA koja kodira gama tubulin viših biljaka poznat je u vrstama *Arabidopsis thaliana*, kukuruzu i duhanu. Liu i sur. (1994) napravili su antitijela na biljni gama tubulin koristeći i biljno specifičnu C-terminalnu sekvencu peptida. Imunolokalizacija korištenih antitijela pokazuje raspored gama tubulina u biljnim stanicama. Rezultati su neobičajno različiti od onoga nađenog u stanicama koje sadrže centrosome. Gama tubulin je otkriven za vrijeme cijelog staničnog ciklusa i na njemu je povezanost sa slaganjem mikrotubula, uključujući i preprofaznu vrpču i fragmoplast. Na njemu je na površini jezgre što je i otkriveno za mjesto nukleacije mikrotubula. Općenito je prihvaćena njegova prisutnost na negativnom polu mikrotubula kojim su povezani sa jezgrom (Canaday i sur., 2000).

2.2.1. Eksperimentalni dokazi gama tubulina

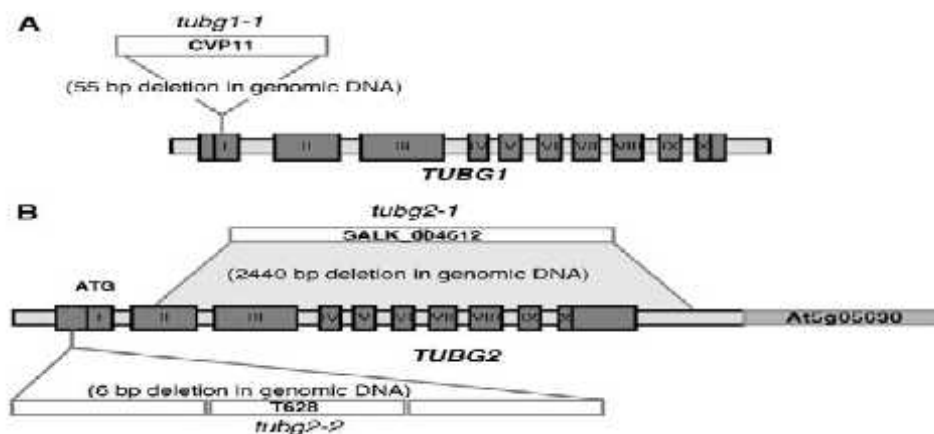
U kulturi duhana upotrebom alfa tubulina obilježenog zelenim fluorescencijskim proteinom (GFP) dokazana je nužnost postojanja mikrotubula za nukleaciju novih. Prema tom modelu izveć postojanja mikrotubula grana se cijela struktura. Još bolji model je korištenje sustava bez biljnih stanica, u kojem se uzimaju samo kortikalni mikrotubuli duhanskih stanica, što se često naziva „duhovi“ plazmine membrane, ekstrakt citosola te proizvedeni tubulin. Ovakav bezstanični sustav potiče grananje postojanja mikrotubula stvaranjem novih.

Drugi primjer je inaktivacija gena za gama tubulin kod *Arabidopsis thaliana*. Binarová i sur. (2003) koristili su male interferirajuće RNA molekule (siRNA) za utišavanje TUBG1 i TUBG2 gama tubulinskih gena koji pokazuju iznimno visoku sličnost na razini DNA. Ukoliko nedostaje gama tubulin, nema ni stvaranja mikrotubula što rezultira smrću u biljke u kotiledonskoj fazi embriogeneze. Pri djelomičnom gubitku gama tubulina biljka može napredovati kroz mitozu ali s velikim poremećajima u citokinezi.

Tre i primjer je izazivanje mutacija koje dovode do gubitka funkcije gena (loss of function), koje su radili Pastuglia i sur. (2006). Napravljeni su mutanti gena TUBG1 i TUBG2 (kombinacije alela: *tubg1-1*, *tubg2-1*, *tubg2-2*) te su na T-DNA uneseni u uro njak. Mutacija sa alelom gena *tubg1-1* se ugrađuje u prvi ekson gena TUBG1 uz deleciju kodirajuće regije od 55pb. Mutacija *tubg2-1* uzrokuje izrezivanje velikog dijela gena TUBG2, a *tubg2-2* se ugrađuje u 5' netranslatirajuću regiju gena TUBG2 (Slika 4.). Odvojeno, homozigotni mutanti nisu imali fenotipske promjene od divljeg tipa. Križanjem homozigotnih *tubg1-1* sa homozigotnim *tubg2-1* ili *tubg2-2* dobiveni su dvostruki mutanti koji pokazuju nenormalan fenotip:

- a) *tubg1-1 tubg2-1*: smrtnost u stadiju gametofita. Pretpostavljeno je da dolazi do null mutacije. Stvara se diobeno vreteno i fragmoplast sa greškom što utječe na diobu stanice.
- b) *tubg1-1 tubg2-2*: moguća sinteza male količine gama tubulina što omogućuje embriogenezu i razvoj mlade biljke u ranim stadijima. To je propusna mutacija. Štetnost mutacije, tj. ove kombinacije alela se očituje u kasnim razvojnim stadijima sadnice i dovodi do smrti tri tjedna nakon klijanja (Pastuglia i sur., 2006).

Nakon otkrića dvostrukih mutanata, korišten je GFP za praćenje gama tubulina i njegovog smanjivanja i utjecaja na dinamiku mikrotubula. U dvostrukim mutantima je stanični ciklus duplo duži i jako promjenjiv, što može dovesti do defekta u citokinezi u RNAi mutantima. (Eckardt, 2006).



Slika 4. Mjesta ugradnje mutiranih gena gama tubulina kloniranih na T-DNA i unesenih u uro njak. A) Mutirani gen sa kombinacijom alela *tubg1-1* ugrađuje se u prvi ekson gena TUBG1 uz deleciju 55pb. B) Mutirani gen *tubg2-1* uzrokuje deleciju velikog dijela gena TUBG2, a *tubg2-2* se ugrađuje u 5' netranslatirajuću regiju gena TUBG2. (Prema Pastuglia i sur.,2006).

2.3. Proteini pridruženi mikrotubulima

Proteini povezani nespecifično sa mikrotubulima, MAPs (od engl. microtubule-associated proteins) moduliraju nukleacijsku aktivnost na površini jezgre biljne stanice na način da reguliraju izduživanje i skraćivanje mikrotubula. (Canaday, 2000). Otkriveni su prilikom pročišćavanja tubulina kada je nakon nekoliko ciklusa pročišćavanja uočena prisutnost drugih proteina, ne samo tubulina. Detaljnijom analizom dokazana je njihova povezanost sa mikrotubulima.

In vitro testovima dokazano kako ti proteini potiču u brže sastavljanje mikrotubula. Nadalje, važni su u njihovom stabiliziranju na način da neutraliziraju odbijanje suprotno nabijenih alfa i beta tubulina. Vezanjem tih proteina na površinu mikrotubula sprječeno je disocijanje tubulinskih podjedinica, a time i skraćivanje mikrotubula. Fosforilirani proteini ne mogu se vezati za mikrotubule, što potiče njihovo skraćivanje. (Preuzeto sa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5428>).

2.4. Biljni motor proteini

Najvažniji su mikrotubulski motor proteini dinein i kinezin te kinezinu slični proteini (KLPs, od engl. Kinesin-Like Proteins). Ti motori pridonose organizaciji diobenog vretena u mitozu i mejozi. Orijentirani su prema negativnom kraju mikrotubula.

U vrste *Arabidopsis Thaliana* otkriveno je nekoliko kinezinu sličnih gena, kat A, kat B, kat C. Otkriveni su i proteini slični kinezinu koji vezuju kalmodulin i imaju motor domenu na C-terminalnom kraju i aktivnost usmjerenu prema negativnom kraju (KCBPs, od engl. Kinesin-like Calmodulin-Binding Proteins). Istraživanjima je potkrijepljena hipoteza o sudjelovanju tih motor proteina u stvaranju diobenog vretena u acentrosomalnim biljnim stanicama. U endospermu vrste *Haemanthus*, prema istraživanju Smirnovе i sur. (1998), KCBP je bio imunolokaliziran u diobenim vretenima u anafazi što podržava hipotezu da motor proteini mogu biti uključeni u stvaranje vretena u acentrosomalnim biljkama na način da okupljaju pretpostojeće mikrotubule. Kinezinu slični motori usmjereni prema pozitivnim krajevima nađeni su kod BY-2 stanica duhana u fragmoplastu i mogu sudjelovati u premještanju ekvatornih mikrotubula (Canaday i sur., 2000).

2.5. Kontrola nukleacije

Stanice viših biljaka imaju različite tipove citoskeleta koji se uspješno sastavljaju pod kontrolom stanih ciklusa i/ili razvojnim kontrolama. Nukleacija mikrotubula na površini jezgre je pod kontrolom stanih ciklusa, a može biti regulirana citoplazmatskim aktivatorima, uključujući i ciklin-ovisne kinaze (CDKs, od engl. Cyclin-Dependent Kinases). Centrosom u životinjskim stanicama i polarno tijelo kod gljiva također djeluju kao kontrolni centri jer povezuju signalne putove za nukleaciju stanih procesa. Proteini uključeni u nukleaciju mikrotubula mogu biti zajednički i/ili pod zajedničkom regulacijom (Lüders i Stearns, 2007).

2.6. Biljni mutanti s defektom u sastavljanju diobenog vretena

Istraživanja na mutantima vrste *Arabidopsis thaliana* i kukuruzu rezultiraju nepravilnim sastavljanjem ili funkcioniranjem citoskeleta. U mutantu urođnjaka *Ton* se javlja nenormalni položaj stanih ploče i patuljasti rast te sterilnost. Fragmoplast i diobeno vreteno su pravilno sastavljeni. Nikada se ne stvara preprofazna vrpca. U mutantima *Fass* su uočeni slični poremećaji. U usporedbi sa divljim tipom, *Fass* i *Ton* mutanti pokazuju zaostalost u rastu (Slika 5). U mutantima *Pilz* tijekom stanih ciklusa prekida se sastavljanje mikrotubula i njihova aktivnost. To dovodi do zaustavljanja razvoja embrija u ranim fazama. Svi ti poremećaji u organizaciji citoskeleta utječu na razvoj biljke sa posljednjim promijenjenim izgledom biljke (Canaday i sur., 2000).



Slika 5. Mutanti *Arabidopsis thaliana*. *Ton* mutanti pokazuju zaostalost u rastu (prve tri slike) u usporedbi sa divljim tipom (zadnja slika). (Preuzeto i prilagođeno prema: <http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/sgap/equip/es/cyto/projet/details3.html#>).

2.7. Središta organizacije mikrotubula

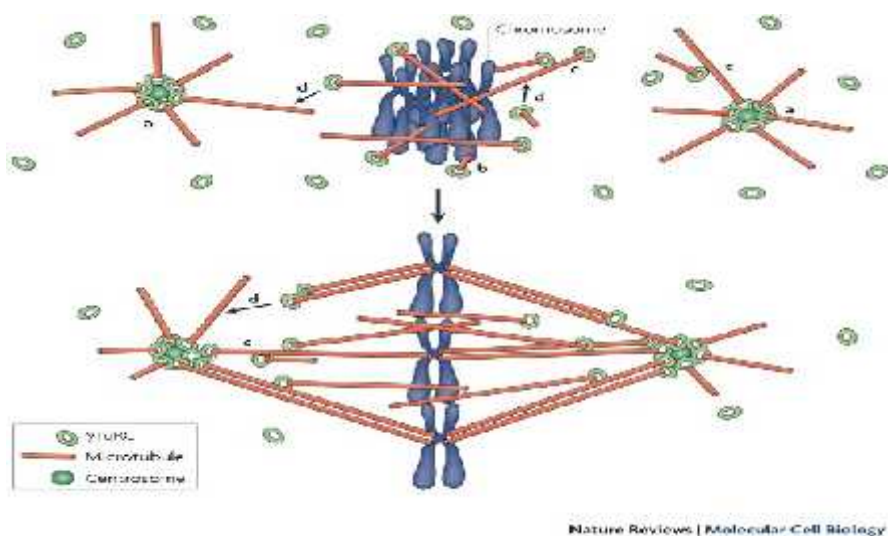
Središta organizacije mikrotubula (MTOC, od engl. Microtubule Organizing Center) u po etku istraživanja označavaju sve strukture koje sastavljaju i organiziraju nizove mikrotubula. Ovaj naziv su uveli Pickett-Heaps. Najvažniji su centrosom kod životinjskih stanica i polarno tijelo kod kvasca. MTOC je često korišten kao sinonim za centrosome, otkako je otkriveno da je gama tubulin odgovoran za nukleaciju mikrotubula, a nalazi se na centrosomima. Nova definicija mikrotubula podrazumijeva strukture koje mogu katalizirati vlastitu nukleaciju ovisnu o gama tubulinu i mogu sidriti mikrotubule na udjelovanjem sa njihovim negativnom krajem, pozitivnim krajem ili bilo kojim stranom.

Kompleksi koji nukleiraju mikrotubule kod biljaka mogu biti povezani sa različitim strukturama, npr. sa postojećim mikrotubulima. Takvi nukleiraju i kompleksi mogu biti sastavom slični materijalu koji organizira mikrotubule u pericentriolarnom materijalu kod životinjskog centrosoma (Lüders i Stearns, 2007).

3. USPOREDBA BILJNIH STANICA SA ŽIVOTINJSKIM STANICAMA

3.1. Gama tubulinski kompleksi kod životinjskih stanica

Gama tubulin koji se nalazi u pericentriolarnom materijalu udružen je sa mnoštvom drugih proteina koji ine konzerviranu proteinsku obitelj. Kod ljudi su nazvani gama kompleks proteini (GCPs, od engl. Gamma Complex Proteins), a njihovi ortolozi se nalaze u drugim vrstama. Kod razli itih vrsta, ti se proteini nalaze u razli itom broju. Veliki gama tubulinski kompleks kod kralješnjaka sadrži puno GCP-a i naziva se gamaTuRC (od engl. Gama Tubulin Ring Complex) jer ima karakteristi an oblik prstena (Slika 6.) kad se gleda elektronskim mikroskopom. Taj kompleks stabilizira negativne krajeve mikrotubula, odnosno prekriva ih i na taj na in sprje ava depolimerizaciju. Za sidrenje mikrotubula su potrebni dodatni proteini. Jedan od njih je ninein na en na dijelu centriola. Otkriveno je mnogo komponenti pericentriolarnog materijala, no samo je dio njih uklju en u funkciju centrosoma kao mikrotubulskog organizacijskog centra (Lüders i Stearns, 2007).



Slika 6. Shematski prikaz gama tubulinskog kompleksa. Vide se kromosomi (plavo), mikrotubuli (crveno), centrosomi (zeleno), kompleks gama tubulina (sivo). Gama tubulinski kompleks blizu centrosoma (a) i kromatina (b). Uz postoje e diobeno vreteno vezani gama tubulinski kompleksi (c) sastavljaju nove mikrotubule koji ine vreteno. Gama tubulinski kompleksi na minus krajevima mikrotubula (d) usmjeravaju ih prema drugim mikrotubulima. (Preuzeto sa: <http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n2/thumbs/nrm2100-f2.jpg>).

3.2. Sekundarna središta organizacije mikrotubula kod centrosomalnih stanica

Postoje istovremeno sa primarnim središtima (centrosom i polarno tijelo). To su necentrosomalna mjesta nakupljanja gama tubulina. Sawin i Tran (2006) su ih proučavali kod kvasca. Sekundarna središta organizacije mikrotubula prisutna su uz polarno tijelo, primarno središte, u interfazi i mitozu, te su zato podijeljeni na:

a) Interfazna (i) središta organizacije mikrotubula koja nukleiraju i sidre mikrotubule na površini jezgre. Nastaju u mitozu, a mikrotubuli se sastavljaju posredstvom polarnog tijela.

b) Ekvatorijalna (e) središta organizacije mikrotubula koja nastaju na početku citokineze. Povezani su sa kontraktilnim prstenom gdje se stanica dijeli.

Iz eksperimenata Sawina i Trana (2006) se zaključuje kako su u životinjskim stanicama bitna sekundarna središta u organizaciji mikrotubula. Drugim riječima, nukleacija posredovana gama tubulinom nije ograničena samo na centrosome.

Postoje brojna mjesta koja imaju barem neka svojstva sekundarnih središta organizacije mikrotubula. Neka su navedena u Tablici 1.

Tablica 1. Sekundarna središta organizacije mikrotubula te na koji način su uključena u udjelovanje s mikrotubulima, uz prisutstvo gama tubulina (Prilagođeno prema Lüders i Stearns, 2007). MT = mikrotubul.

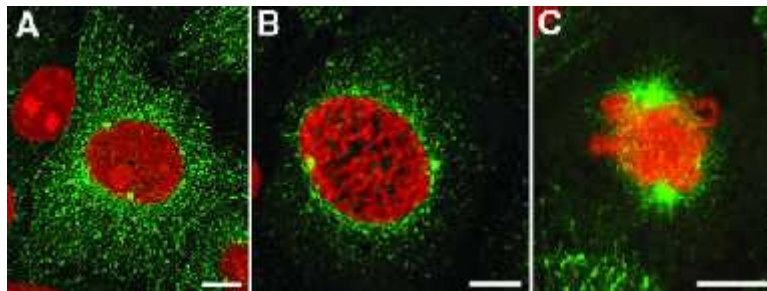
Sekundarno mjesto organizacije MT-a	Svojstva
Bazalno tijelo	Citoplazmatski MT-i vezani krajevima za bazalnu nožicu
Polarizirana epitelna stanica	Minus krajevi MT-a usidreni u apikalnu membranu. Kortikalna membrana sidri MT-e sa obje strane i sudjeluje u njihovoj dinamici. Sastavljanje MT-a na centrosomu, a nije dokazano na kortikalnoj membrani.
Golgijevo tijelo	Sastavlja i sidri MT-e s citoplazmatske strane u prisutstvu gama tubulina
Mitotsko vreteno	Sidri MT-e na krajevima te s obje strane
Jezgrina ovojnica mišićne stanice	Sidri minus krajeve MT-a
Kromosomi u mitozu	kinetohorima sidri plus krajeve MT-a

3.3. Nastanak diobenog vretena posredstvom kromosoma

U in vivo istraživanju Mahoney i sur. (2006), koristili su *D.melanogaster* S2 stanice. Iscrpljivanjem centrosomina, diobeno vreteno koje nastaje nema astralne mikrotubule. Gama tubulin je i dalje prisutan na mikrotubulima koji tvore diobeno vreteno, ali je nefunkcionalan. Trajanje mitoze je podjednako kao kod stanica divljeg tipa. Nadalje, nakon iscrpljivanja gama tubulina RNA interferencijom, mikrotubuli mogu i dalje tvoriti diobeno vreteno. Njihovo porijeklo je moguće i sa ve postoje ih mikrotubula. Diobeno vreteno u skoro polovici slučajeva nastaje unipolarno, a onda se nešto stvara i drugi pol vretena. Mitoza traje puno duže nego kod stanica divljeg tipa. Zaključuje se da gama tubulin ne mora biti smješten u centrosomu da bi stimulirao sastavljanje mikrotubula.

Još ve i dokaz da diobeno vreteno samo sebi služi za stvaranje novih mikrotubula je korištenjem proteina EB1 obilježenog GFP-om (Slika 7). EB1 je protein koji se veže na pozitivne krajeve mikrotubula. Praćenje mikroskopom obilježenog plus kraja mikrotubula u diobenom vretenu, uočava se pomicanje mikrotubula prema kromosomima.

Diobeno vreteno se stvorilo, bilo da su mikrotubuli bili nukleirani sa kromosoma ili su se ugrađivali od prethodne mreže mikrotubula koji ve postoje. Ovo je dokaz da kromosomi mogu biti mjesta nukleacije mikrotubula (Mahoney, 2006).



Slika 7. EB1-GFP lokalizacija (profaza). A) rana profaza: EB1-GFP vezan za mikrotubule koji se protežu kroz citoplazmu. B) kasna profaza: mikrotubuli označeni u blizini jezgre. C) prometafaza: nastanak diobenog vretena i mikrotubuli obilježeni sa EB1-GFP.

(Preuzeto sa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151569/>).

4. LITERATURA

Canaday, J., Stoppin-Mellet, V., Mutterer, J., Lambert, A.-M. i Schmit, A.-C., 2000. Higher plant cells: gamma-tubulin and microtubule nucleation in the absence of centrosomes. Wiley-Liss, Inc.

Eckardt, N., 2006. Function of gamma-tubulin in plants. The plant cell.

Lüders, J., Stearns, T., 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. Nature reviews.

Mahoney, N.M., Goshima, G., Douglass, A.D. i Vale, R.D. 2006. Making microtubules and mitotic spindle in cells without functional centrosomes. Current biology.

Pastuglia, M, Azimzadeh, J, Goussot, M, Camilleri, C, Belcram, K, Evrard, J.-L., Schmit, A.C., Guerche, P. i Bouchez D., 2006. Gamma tubulin in essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*. The plant cell.

Vantard, M, Levilliers, N, Hill, A.M, Adoutte, A, Lambert, A.M. 1990. Incorporation of *Paramecium* axonemal tubulin into higher plant cells reveals functional sites of microtubule assembly. Proc Natl Acad Sci USA.

<http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/sgap/equipes/cyto/projet/details3.html#>

<http://www.life.illinois.edu/ib/102/lectures/08mit&veg102.html>

<http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n2/thumbs/nrm2100-f2.jpg>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5428>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151569/>

http://vbaulin.front.ru/research/a_microtub.html

5. SAŽETAK

Najvažnija komponenta stanice odgovorna za sastavljanje mikrotubula je gama tubulin. On potiče dimerizaciju alfa i beta tubulina i tako nastanak mikrotubula. Lokaliziran je naročito na površini jezgre biljnih stanica koja je otkrivena kao glavna mjesta sastavljanja mikrotubula. Također, kortikalna membrana i fragmoplast su mjesta na kojima se mikrotubuli sastavljaju. Visoka dinamika sastavljanja i rastavljanja mikrotubula vrlo je bitna kod diobe stanice kada se mikrotubuli intenzivno premještaju. Proteini povezani sa mikrotubulima imaju važnu ulogu u njihovoj stabilizaciji te pomažu sastavljanje mikrotubula.

Buduća istraživanja bi trebala razjasniti molekularnu funkciju proteina koji potiču izduživanje mikrotubula na acentrosomalnim polovima i unutar diobenog vretena. Također, kontrolni mehanizmi koji reguliraju funkciju mikrotubulskih organizacijskih centara su još nedovoljno otkriveni.

6. SUMMARY

The most important component of the cell, responsible for microtubule assembly is gamma-tubulin. Gamma-tubulin induce polymerisation of alpha and beta tubulin so as microtubule assembly. Its localized mostly on the nuclei surface, and this site is discovered as most active nucleating site of microtubules. Cortical membrane and phragmoplast are also sites of microtubule assembly. Highly dynamic assembly and disassembly of microtubules is very important in mitosis when microtubules fast move in the cell. Proteins associated with microtubules are very important in stabilization of microtubules and for their assembly.

Further researches should explain molecular function of proteins which induce polymerization of microtubules on acentrosomal poles and in mitotic spindle. Also, control points of regulation microtubule's organization centers are still insufficient explained.