Optogenetička metoda za brzo i reverzibilno uklanjanje proteina iz diobenog vretena

Milas, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:814147

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ana Milas

OPTOGENETIČKA METODA ZA BRZO I REVERZIBILNO UKLANJANJE PROTEINA IZ DIOBENOG VRETENA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2017.

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

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

Deep revelations into the nature of living things continue to travel on beams of light.

Daniel Mazia, 1996

Zahvale

Najveća zahvala mojoj mentorici Ivi. Hvala na svim pruženim prilikama i savjetima u posljednje tri godine. Hvala na uvijek pozitivnom stavu i što mi je pokazala da se može. Hvala na velikom povjerenju zbog kojeg sam neizmjerno puno naučila i napredovala.

Hvala Sonji na pomoći i savjetima vezanima za kloniranje i što mi je gulila naranče.

Hvala svim ostalim članovima grupe Tolić što su moje vrijeme provedeno u labu učinili malo manje produktivnim, ali znatno zabavnijim. Hvala na vrhunskim diskusijama, što o znanosti, što o životu. Najviše od svega, hvala vam svima što ste trpjeli moja pametovanja s kauča i moje užasne životne savjete. Prema redoslijedu pojavljivanja na web stranici http://tolic.irb.hr/people (datum pristupa 8. srpnja 2017.): hvala magistrima života Čiči, Kruni i Renko; hvala Jeleni; hvala mojoj doktorandici Barbari; hvala Juri, Mihaeli, Patriku i Flancu. Na kraju, posebno hvala mojoj (jako mladoj i kul) lab mami Ivani.

Hvala Neni i svim članovima grupe Pavin na uvijek potrebnom odmoru od biologa. Posebno hvala Marcelu na dijeljenju tajni interneta koje nikad nisam željela saznati.

Hvala doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na korisnim komentarima i pokazanom interesu za ovaj diplomski rad.

Hvala svim prijateljima, kolegama i slučajnim prolaznicima koji su bili dio mojih studentskih dana i zbog kojih je ovih pet godina prošlo upravo tako kako je prošlo. Jer da je bilo drugačije, ne bi valjalo. Posebna zahvala ide onim kolegama koji su redovito pohađali predavanja i vodili bilješke. Iskreno mogu reći da bez vas sve ovo ne bi bilo moguće.

Hvala svim članovima moje obitelji što su me uvijek podržavali i puštali da radim što želim, čak i kad im nije bilo jasno što radim i zašto to želim raditi. Posebno hvala Materi i Ćaći što su mi dali sve, a moje je bilo samo da učim.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XI**
ABSTRACT ..... **XIII**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **2**
2.1. Stanični ciklus eukariota **2**
2.2. Stanična dioba **3**
2.3. Diobeno vreteno **5**
2.3.1. Struktura mikrotubula i njihova organizacija u diobenom vretenu *5*
2.3.2. Proteini u diobenom vretenu *8*
2.3.3. Sile u diobenom vretenu *10*
2.4. Metode za inaktivaciju proteina **12**
2.4.1. RNA interferencija *12*
2.4.2. Metode za brzu inaktivaciju proteina *12*
2.5. Optogenetičke metode **13**
2.5.1. Primjena optogenetičkih metoda u staničnoj biologiji *14*
2.5.2. Dimerizacija inducirana svjetlom *15*
§ 3. MATERIJALI I METODE **17**
3.1. Dizajn i konstrukcija plazmida **17**
3.1.1. Umnažanje kodirajućih sljedova pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) *19*
3.1.2. Priprema agaroznog gela i pročišćavanje PCR-produkta *20*
3.1.3. Linearizacija i pročišćavanje plazmida *21*
3.1.4. In-Fusion reakcija *21*
3.1.5. Transformacija bakterija *22*
3.1.6. PCR na kolonijama *22*
3.1.7. Izolacija rekombinantnog plazmida *23*
3.2. Stanična kultura **24**
3.2.1. Uzgoj stanica *24*
3.2.2. Transfekcija plazmidne DNA i siRNA *24*
3.2.3. Priprema stanica za mikroskopiranje *25*
3.2.4. Imunocitokemija *25*
3.3. Svjetlosna mikroskopija i aktivacija svjetlom **26**

3.3.1. Postavke za snimanje stanica koje eksprimiraju Venus-iLID-Mito i tgRFPt-SspB-TACC3 ili tgRFPt-SspB-KIF18a *26*

3.3.2. Postavke za snimanje stanica koje eksprimiraju Venus-iLID-Mito i PRC1-tgRFPt-SspB *27*

3.3.3. Postavke za snimanje stanica nakon provedene imunocitokemije *27*

3.4. Analiza snimaka i kvantifikacija podataka **27**

3.4.1. Analiza kinetike uklanjanja proteina TACC3 ..... *27*

3.4.2. Analiza intenziteta PRC1 i tubulin signala u diobenom vretenu *28*

3.4.3. Analiza oblika i veličine diobenog vretena *28*

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **29**

4.1. Prikaz razvijene optogenetičke metode **29**

4.2. Uklanjanje proteina TACC3 iz diobenog vretena **31**

4.2.1. Razvijena metoda omogućuje brzo i reverzibilno uklanjanje proteina TACC3 iz diobenog vretena *31*

4.2.2. Kinetika reverzibilnog uklanjanja proteina TACC3 ..... *34*

4.3. Uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena **38**

4.3.1. Razina ekspresije proteina PRC1 u stanici utječe na proces translokacije proteina *38*

4.3.2. Uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena uzrokuje raspadanje svežnjeva mikrotubula *43*

4.3.3. Reverzibilno uklanjanje PRC1 uzrokuje promjenu oblika diobenog vretena *46*

4.3.4. RNA interferencijom smanjena je količina endogenog proteina PRC1 u metafazi *50*

4.3.5. Reverzibilno uklanjanje proteina PRC1 nakon RNA interferencije *52*

4.4. Vezanje mitohondrija i kinezina-8 uzrokuje transport mitohondrija na diobeno vreteno **59**

§ 5. ZAKLJUČAK **61**

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA **63**

§ 7. LITERATURNI IZVORI **65**

§ 8. ŽIVOTOPIS ..... **LXXII**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

OPTOGENETIČKA METODA ZA BRZO I REVERZIBILNO UKLANJANJE PROTEINA IZ DIOBENOG VRETENA

Ana Milas

Na početku mitoze mikrotubuli i pripadajući proteini formiraju diobeno vreteno, strukturu koja omogućuje točnu raspodjelu kromosoma između dvije stanice kćeri. U ovom radu razvijena je optogenetička metoda koja omogućuje brzu i reverzibilnu translokaciju proteina iz diobenog vretena na mitohondrije korištenjem plavog svjetla. Metoda je primijenjena za proučavanje proteina TACC3 i PRC1 koji sudjeluju u formiranju paralelnih, odnosno antiparalelnih svežnjeva mikrotubula. Translokacija oba proteina događala se na vremenskim skalama od nekoliko minuta. Mijenjanjem koncentracije proteina PRC1 na diobenom vretenu bilo je moguće inducirati raspadanje i ponovno formiranje antiparalelnih svežnjeva mikrotubula što je rezultiralo promjenom oblika diobenog vretena. Dakle, ova metoda predstavlja novi moćni alat za proučavanje proteina diobenog vretena kontrolom njihove lokalizacije u pojedinim fazama mitoze.

(70 stranica, 34 slike, 7 tablica, 67 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: kontrola svjetlom, LOV domena, metafaza, mikrotubuli, mitoza, PRC1, TACC3

Mentor: prof. dr. sc. Iva Tolić
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Ocjenitelji:
1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zamjena: prof. dr. sc. Davor Kovačević

Datum diplomskog ispita: 11. srpnja 2017.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

OPTOGENETIC METHOD FOR RAPID AND REVERSIBLE REMOVAL OF PROTEINS FROM THE MITOTIC SPINDLE

Ana Milas

At the onset of mitosis microtubules and microtubule associated proteins form a spindle, which is responsible for proper segregation of chromosomes between two daughter cells. In this thesis, I have developed optogenetic method for rapid and reversible translocation of proteins from the mitotic spindle to mitochondria using blue light. This method was used for studying TACC3 and PRC1, proteins which are required for formation of parallel and antiparallel microtubule bundles, respectively. Translocation of both proteins occurred at time scales of several minutes. By changing concentration of PRC1 in the mitotic spindle, I was able to induce disassembly and formation of antiparallel microtubule bundles, which resulted in changes in the spindle shape. Thus, this method represents powerful new tool for studying spindle proteins by controlling their localization at specific stages of mitosis.

(70 pages, 34 figures, 7 tables, 67 references, original in Croatian)

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

Keywords: light control, LOV domain, metaphase, microtubules, mitosis, PRC1, TACC3

Mentor: Dr. Iva Tolić, Professor
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec., Assistant Professor

Reviewers:
1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
2. Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor

Substitute: Dr. Davor Kovčević, Professor

Date of exam: 11th July 2017

§ 1. UVOD

Stanična dioba je proces kojim se jedna stanica dijeli na dvije. Ovaj proces nužan je za rast, razvoj i održavanje višestaničnih organizama. Greške u raspodjeli genetičkog materijala do kojih dolazi prilikom diobe mogu uzrokovati pojavu brojnih bolesti i defekata.[1] Zadaću pravilnog razdvajanja kromosoma tijekom mitoze ima diobeno vreteno, visokoorganizirana struktura sastavljena od mikrotubula i pripadajućih proteina.[2]

Za proučavanje uloge pojedinih proteina u diobenom vretenu najčešće se koristi metoda RNA interferencije kojom se utišava ekspresija ispitivanih proteina.[3] Iako je primjena ove metode dovela do brojnih značajnih otkrića u području stanične diobe, sve se češće naglašavaju problemi u interpretaciji fenotipa dobivenih ovom metodom. Naime, ova metoda djeluje na vremenskoj skali od nekoliko dana te njome nije moguće inaktivirati protein u određenoj fazi stanične diobe. Ovo može biti problem kod istraživanja proteina koji imaju uloge u različitim fazama diobe. Zbog toga je potrebno razviti metodu koja bi omogućila inaktivaciju proteina na vremenskoj skali od nekoliko minuta.

Posljednjih godina optogenetičke metode sve više dobivaju na popularnosti u istraživanjima u staničnoj biologiji. Ove metode koriste fotosenzitivne proteinske domene u svrhu kontrole aktivnosti proteina korištenjem svjetla. Do danas je optogenetika korištena za kontroliranje brojnih staničnih procesa kao što su signalizacija,[4, 5] transport i lokalizacija organela i proteina u stanici[6, 7] te transkripcija gena.[8]

Cilj ovog rada bio je razviti optogenetičku metodu koja će omogućiti brzu i reverzibilnu translokaciju proteina iz diobenog vretena na mitohondrije za vrijeme mitoze. U tu svrhu korišten je sustav koji omogućuje reverzibilno induciranje dimerizacije proteina korištenjem plavog svjetla.[9] Na ovaj način omogućeno je uklanjanje proteina iz diobenog vretena na vremenskoj skali od nekoliko minuta. Razvijena metoda primijenjena je na proteine TACC3 (engl. *transforming acidic colied-coil protein)* i PRC1 (engl. *protein regulator of cytokinesis 1)* koji sudjeluju u stvaranju i održavanju svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu. Fuzijski proteini eksprimirani su u ljudskim tumorskim stanicama U2OS te je korištenjem fluorescencijske mikroskopije proučavana njihova uloga u metafaznom diobenom vretenu.

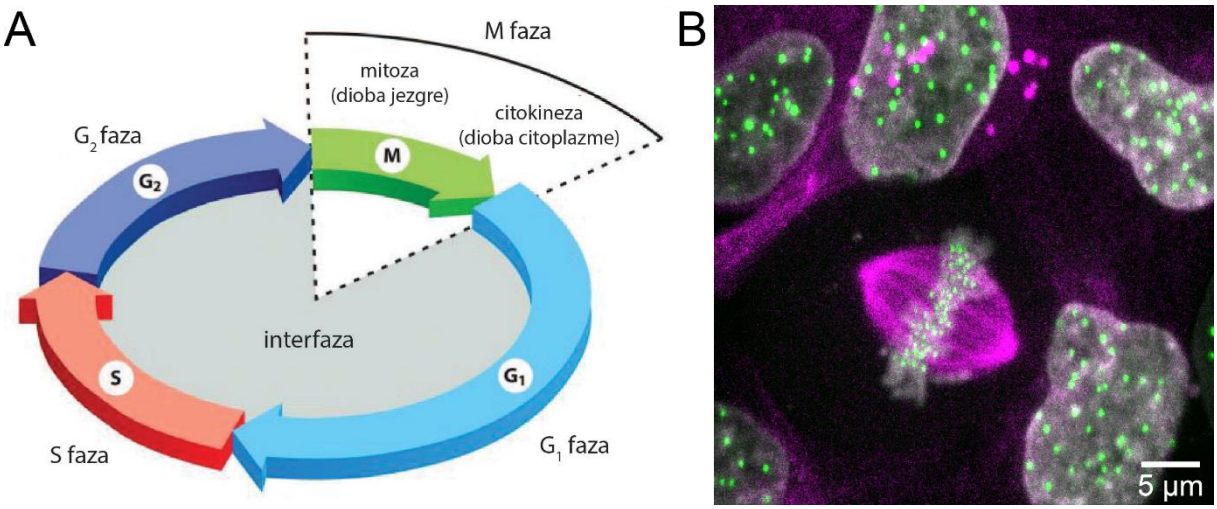
.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Stanični ciklus eukariota

Stanični ciklus eukariotskih organizama sastoji se od četiri faze (slika 1A). Glavne promjene tijekom staničnog ciklusa odvijaju se u S fazi, u kojoj dolazi do replikacije DNA te u M fazi, kada se udvostručeni kromosomi raspodjeljuju u dvije jezgre. U većini stanica postoje dvije G (engl. *gap*) faze koje dijele događaje koji se odvijaju u S i M fazama. G_1, S i G_2 faza zajedno čine interfazu, dok se M faza sastoji od mitoze (diobe jezgre) i citokineze (diobe citoplazme).[10]

Prijelaz između interfaze i mitoze praćen je značajnim promjenama u izgledu stanice i organizaciji staničnog citoskeleta, kao i stupnju kondenzacije DNA (slika 1B).

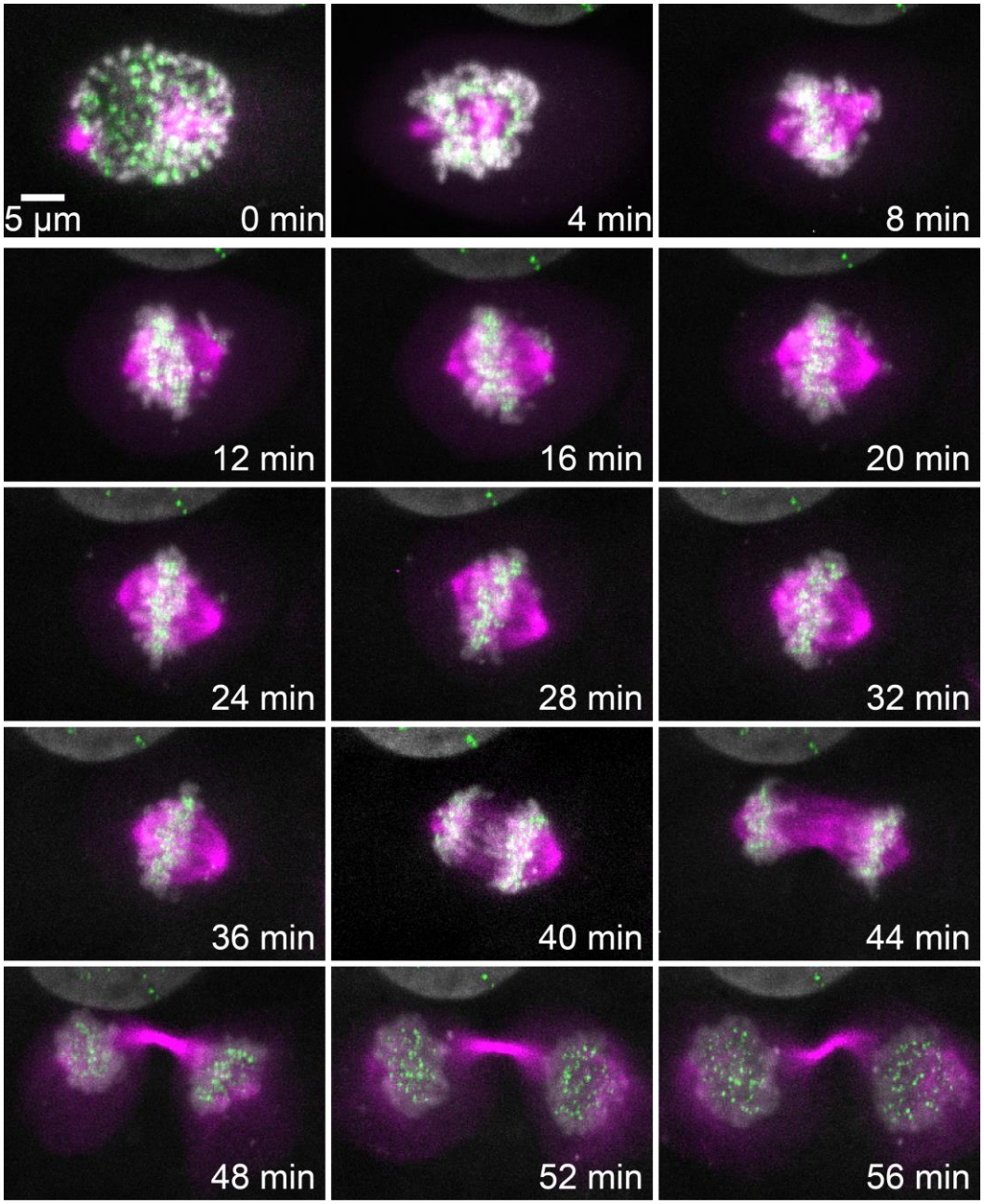


Slika 1. Eukariotski stanični ciklus. (A) Stanični ciklus većine eukariotskih stanica podijeljen je u četiri faze: M (mitoza), G_1 (vrijeme između mitoze i početka replikacije DNA u jezgri), S (vrijeme replikacije nuklearne DNA), G_2 (period između završetka replikacije DNA i mitoze). Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 10. **(B)** Fluorescencijska mikroskopija ljudskih stanica. Mikrotubuli su prikazani u ružičastoj, kinetohore u zelenoj, a DNA u sivoj boji. Stanica u sredini slike nalazi se u mitozi, dok su okolne stanice u interfazi.

Prijelazi između pojedinih faza staničnog ciklusa regulirani su sustavom kontrole staničnog ciklusa. Ovaj sustav aktivira i kontrolira procese staničnog ciklusa kao što su replikacija DNA, mitoza i citokineza u skladu s uvjetima unutar stanice i u njenoj okolini. Glavni regulatori staničnog ciklusa su ciklini i kinaze ovisne o ciklinu (Cdk), protein-fosfataze i ubikvitin-protein-ligaze. U ranoj G_1 fazi, ciklin-Cdk kompleksi nisu aktivni. Na polovici G_1 faze, ciklin-Cdk kompleksi aktiviraju transkripciju gena potrebnih za replikaciju DNA. S faza započinje djelovanjem SCF ubikvitin-protein-ligaze koja poliubikvitinilira inhibitore ciklin-Cdk kompleksa S faze te se inhibitori razgrađuju pomoću proteasoma. Ciklin-Cdk kompleksi S faze tada aktiviraju ishodišta DNA replikacije čime se omogućuje sinteza DNA, nakon čega stanica ulazi u G_2 fazu. U kasnoj G_2 fazi mitotički ciklin-Cdk kompleksi aktiviraju rane korake mitoze.[10]

2.2. Stanična dioba

Dioba ljudske tumorske stanice snimljena fluorescencijskim mikroskopom prikazana je na slici 2. Mitoza se sastoji od nekoliko koraka u kojima dolazi do formiranja diobenog vretena, integracije kromosoma u diobeno vreteno te razdvajanja kromosoma u dvije stanice kćeri. Početak mitoze u većini eukariotskih stanica označava razgradnja jezgrine ovojnice. Zatim u prometafazi dolazi do restrukturiranja mikrotubula i formiranja diobenog vretena te kongresije kromosoma u metafaznu ravninu. U metafazi su kromosomi poredani u ravnini te se provjerava jesu li sestrinske kromatide pravilno spojene na suprotne polove diobenog vretena. Nakon što su kromosomi pravilno poredani i ispravno povezani s polovima, dolazi do ubikvitinacije sekurina što omogućuje razdvajanje sestrinskih kromatida u anafazi. Poliubikvitinaciju sekurina vrši APC/C (engl. *anaphase promoting complex*) koji je ubikvitin-ligaza. Anafaza se dijeli na anafazu A, u kojoj skraćivanje kinetohornih mikrotubula uzrokuje približavanje kromosoma polovima te anafaze B, u kojoj se polovi međusobno razdvajaju. Nakon što su se kromosomi razdvojili, APC/C poliubikvitinilira mitotičke cikline i oni se razgrađuju u proteasomu. U telofazi dolazi do prestanka djelovanja mitotičkih ciklin-Cdk kompleksa, a djelovanjem Cdc14 fosfataze dolazi do dekondenzacije kromosoma, ponovno se stvara jezgrina ovojnica oko novonastalih jezgara te se restrukturiraju mikrotubuli. Nakon mitoze slijedi citokineza, odnosno dioba citoplazme, čime nastaju dvije stanice (slika 2).[10]

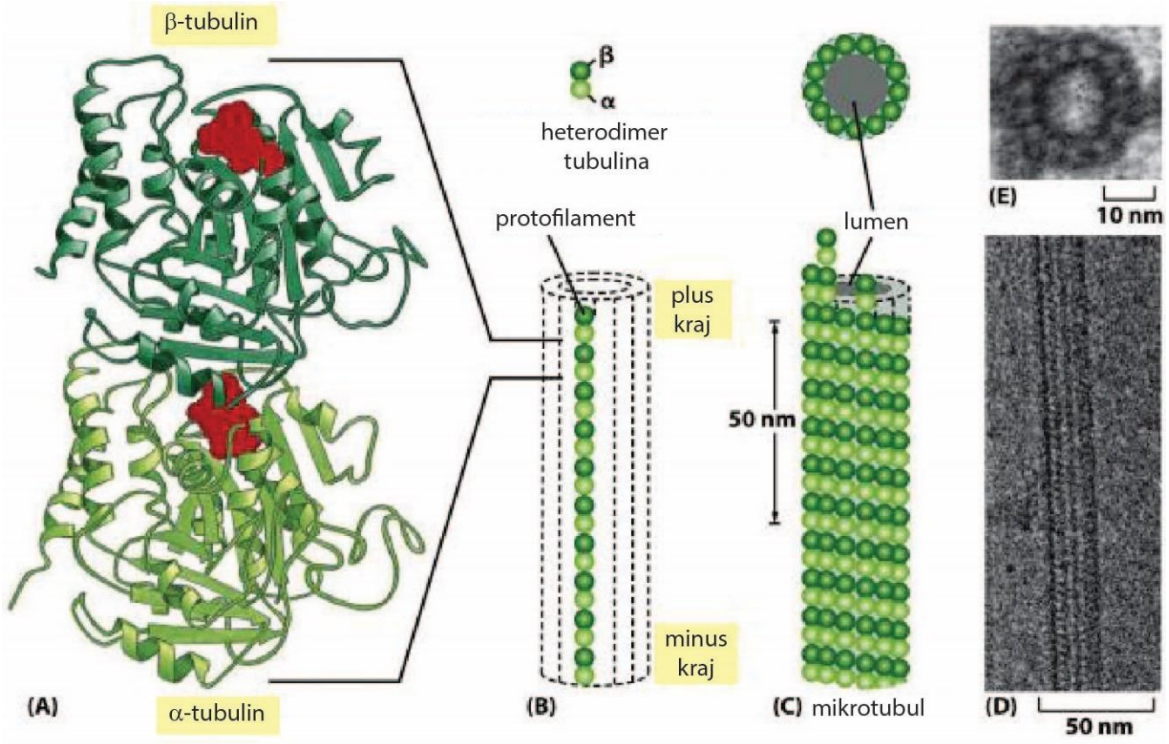


Slika 2. Stanična dioba snimljena fluorescencijskim mikroskopom. U prometafazi (0-24 min) mikrotubuli (ružičasto) formiraju diobeno vreteno te dolazi do integracije kromosoma (sivo) preko kinetohora (zeleno) u diobeno vreteno. U metafazi se kromosomi nalaze poravnati u metafaznoj ravnini (28-36 min), a tijekom anafaze (40 min) dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida. Tijekom telofaze i citokineze (48-56 min) kromosomi se dekondenziraju te nastaje jezgrina ovojnica. Mikrotubuli su obilježeni crvenim fluorescentnim proteinom mCherry, kinetohore zelenim fluorescentim proteinom, a za vizualizaciju DNA korištena je boja SiR-DNA.

2.3. Diobeno vreteno

2.3.1. Struktura mikrotubula i njihova organizacija u diobenom vretenu

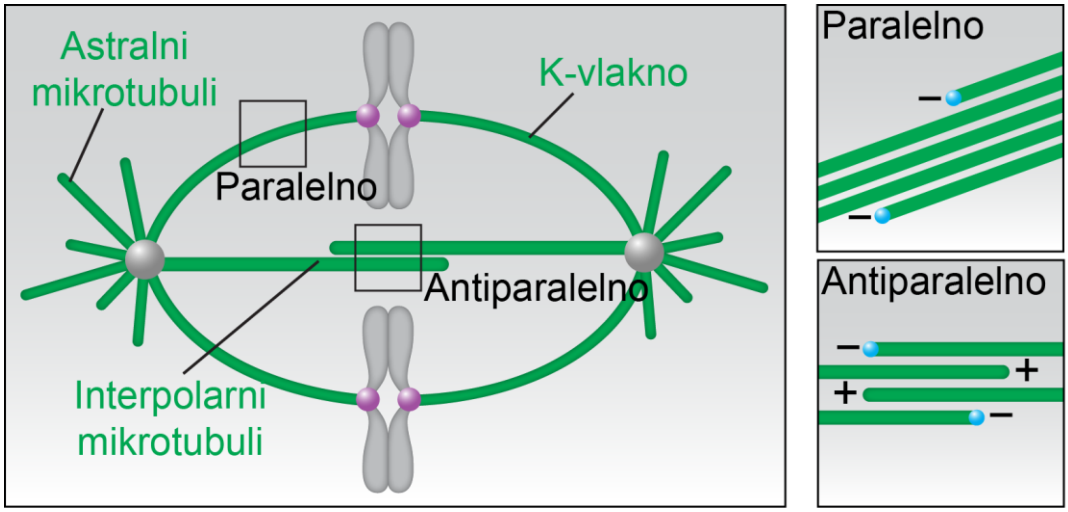
Na početku mitoze dolazi do stvaranja diobenog vretena, strukture sastavljene od mikrotubula i pripadnih proteina čija je zadaća točno podijeliti kromosome između dvije sestrinske stanice.[2] Mikrotubuli su proteinske cjevčice koje nastaju polimerizacijom tubulinskih podjedinica. Ove podjedinice su heterodimeri α- i β-tubulinskih monomera. Jedan mikrotubul sastoji se od 13 paralelno povezanih protofilamenata koji čine šuplju strukturu. Protofilamenti, a time i sami mikrotubuli, su polarne strukture s α-tubulinom na (-) kraju i β-tubulinom na (+) kraju (slika 3).[10]



Slika 3. Struktura mikrotubula. (A) Podjedinica svakog protofilamenta je heterodimer α- i β-tubulinskih monomera. Crveno su označene vezane molekule GTP-a. **(B)** Shematski prikaz jedne podjedinice i jednog protofilamenta. **(C)** 13 paralelno povezanih protofilamenata čine jedan mikrotubul. **(D)** Mikrografija dijela mikrotubula. **(E)** Mikrografija poprečnog presjeka mikrotubula. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 10.

Mikrotubuli su dinamične strukture koje se stalno sastavljaju i rastavljaju. Životni vijek mikrotubula u diobenom vretenu manji je od 1 minute, dok je onaj u interfazi od 5 do 10 minuta. Njihova struktura stabilnija je u neuronima, a još dugotrajnije su strukture sastavljene od mikrotubula u cilijama i flagelumu. Dinamika mikrotubula određena je vezanjem GTP-a na monomere tubulina. GTP se jako čvrsto veže za α-tubulin, dok je u β-tubulinu hidroliza GTP-a u GDP puno brža. Mikrotubul s GTP-β-tubulinom na kraju svakog protofilamenta ima sposobnost rasta. Za razliku od toga, mikrofilament s GDP-β-tubulinom na krajevima protofilamenata stvara savijene strukture koje se brzo razgrađuju te dolazi do depolimerizacije. Izmjene između rasta i razgradnje nazivaju se spas i katastrofa, a regulirane su dodatnim proteinima koji se vežu na mikrotubule. Budući da je hidroliza GTP-a u β-tubulinu puno brža nego u α-tubulinu, (+) krajevi mikrotubula puno su dinamičniji od (-) krajeva.[10]

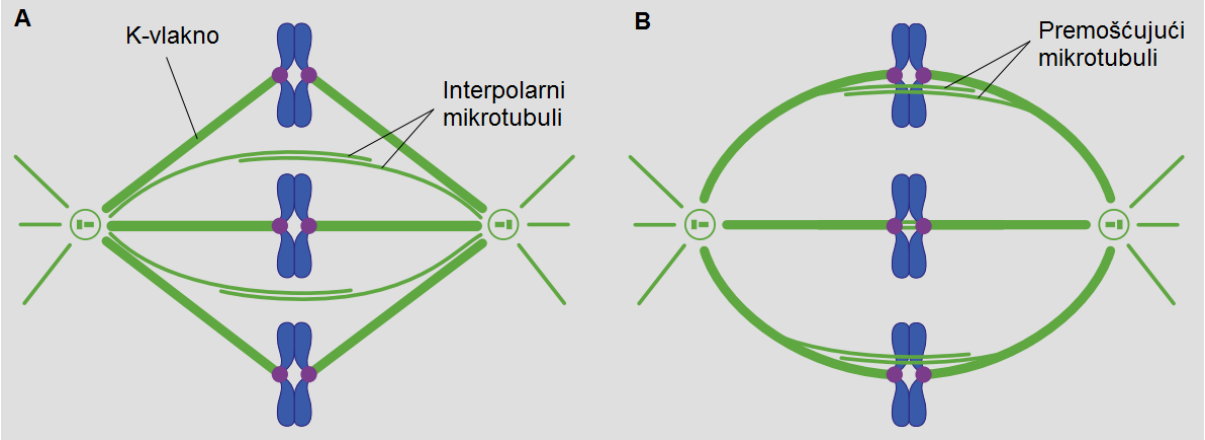
Mikrotubuli u diobenom vretenu organizirani su u svežnjeve. Ovisno o međusobnoj orijentaciji mikrotubula u svežnju razlikujemo paralelne i antiparalelne svežnjeve (slika 4). Najvažniji i najstabilniji paralelni svežnjevi mikrotubula u diobenom vretenu su kinetohorna vlakna (k-vlakna) koja se svojim (+) krajem vežu na kinetohore, proteinske komplekse na kromosomu.[11] Na ovaj način k-vlakna omogućuju povezivanje kromosoma s diobenim vretenom (slika 4). Elektronskom mikroskopijom određeno je da k-vlakna u ljudskim tumorskim stanicama sadrže 12-22 paralelno povezana mikrotubula.[12, 13] Uz k-vlakna, u diobenom vretenu nalaze se još dvije vrste mikrotubula – interpolarni i astralni mikrotubuli. Interpolarni mikrotubuli organizirani su u antiparalelne svežnjeve koji se preklapaju u središnjem dijelu diobenog vretena, a njihov rast u anafazi B uzrokuje razdvajanje polova.[14] Astralni mikrotubuli prostiru se iz polova diobenog vretena u citoplazmu te kroz interakciju sa staničnom korom sudjeluju u pozicioniranju vretena u stanici.[10]



Slika 4. Organizacija mikrotubula u diobenom vretenu. Mikrotubuli u diobenom vretenu organizirani su u paralelne i antiparalelne svežnjeve. K-vlakna su paralelni svežnjevi mikrotubula koji povezuju kinetohore (ljubičasti krugovi) s polovima diobenog vretena. Interpolarni mikrotubuli preklapaju se antiparalelno u središtu diobenog vretena, dok se astralni mikrotubuli prostiru iz polova u citoplazmu te povezuju diobeno vreteno sa staničnom korom. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 2.

Prema klasičnom modelu diobenog vretena, samo mikrotubuli u k-vlaknima, koji su u izravnoj interakciji s kinetohorama, mogu generirati sile na kinetohore. S druge strane, interpolarni mikrotubuli ne interagiraju s kinetohorama, a njihova interakcija s k-vlaknima je slaba i postoji samo u blizini polova (slika 5A).[10] Međutim, u eksperimentima u kojima je korištena elektronska mikroskopija za proučavanje organizacije mikrotubula u diobenom vretenu različitih modelnih organizama primijećeno je postojanje interpolarnih mikrotubula u blizini kinetohora.[15-17] Nedavno je na osnovi eksperimenata u kojima je korištena laserska ablacija pokazano da postoji jaka interakcija između k-vlakana i interpolarnih mikrotubula koji su nazvani premošćujući mikrotubuli (slika 5B).[18] Premošćujući mikrotubuli dobili su ime prema činjenici da premošćuju dva sestrinska k-vlakna, a pokazano je da imaju važnu ulogu u održavanju sile tenzije između kinetohora.[18, 19] Uz to, predložen je model prema kojem postojanje ovih mikrotubula omogućuje održavanje zaobljenog oblika diobenog vretena o čemu će biti više riječi u poglavlju 2.3.3. Naknadno je pokazano da je većina interpolarnih mikrotubula u metafaznom diobenom vretenu povezana s parom sestrinskih k-vlakana te se može smatrati premošćujućim mikrotubulima.[20] Postojanje premošćujućih

mikrotubula u blizini k-vlakana u ljudskim stanicama nedavno je potvrđeno i korištenjem elektronske mikroskopije.[21]



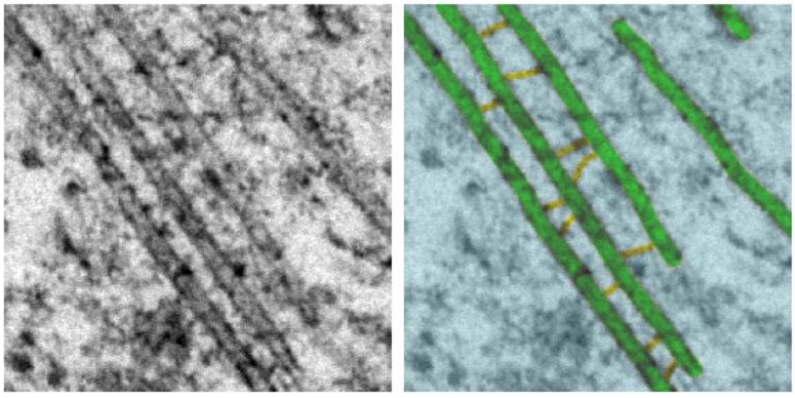
Slika 5. Dva modela metafaznog diobenog vretena. (A) U klasičnom modelu diobenog vretena interpolarni mikrotubuli ne interagiraju s kinetohorama niti s k-vlaknima. **(B)** Prema novom modelu premošćujući mikrotubuli vezani su za k-vlakna u blizini kinetohora. Plavom bojom označeni su kromosomi, a ljubičastom kinetohore. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 22.

2.3.2. Proteini u diobenom vretenu

Osim mikrotubula, bitnu ulogu u organizaciji i funkciji diobenog vretena imaju proteini vezani za mikrotubule (engl. *MAPs, microtubule associated proteins*) koji se mogu podijeliti u četiri skupine. Prvu skupinu čine motorni proteini koji pretvaraju kemijsku energiju u mehaničku što im omogućuje usmjereno kretanje po mikrotubulima. Glavni motorni proteini u diobenom vretenu su dinein i kinezini. Dinein je motorni protein koji se kreće prema (-) krajevima mikrotubula, dok se kinezini razlikuju po smjeru kretanja ovisno o vrsti. Drugu skupinu proteina MAP čine proteini koji se nalaze na (+) kraju mikrotubula (engl. +TIPs, *plus-end tracking proteins*), a treću enzimi koji reguliraju destabilizaciju mikrotubula. Posljednju skupinu proteina MAP čine proteini koji pasivno povezuju mikrotubule, ali se za razliku od motornih proteina ne kreću po mikrotubulima (engl. *passive crosslinking proteins*).[3] U ovu skupinu spadaju proteini TACC3 i PRC1 koji su proučavani u ovom radu.

TACC3 (engl. *transforming acidic colied-coil protein 3*) je ne-motorni protein koji se tijekom mitoze nalazi u kompleksu s proteinima ch-TOG (engl. *colonic and hepatic tumour overexpressed gene*) i klatrinom. TACC3/ch-TOG/klatrin kompleks lokaliziran je na k-

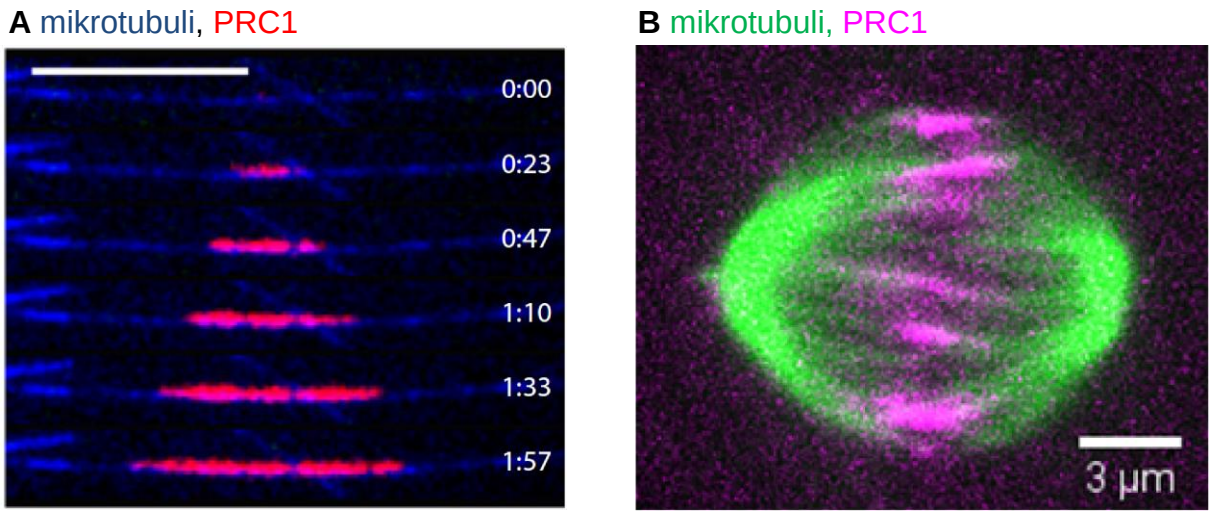
vlaknima diobenog vretena gdje sudjeluje u stvaranju mostova između paralelnih mikrotubula čime pomaže održavanju stabilnosti k-vlakana (slika 6).[23-26]



Slika 6. Elektronska mikroskopija mikrotubula u k-vlaknu. Na slici se vidi postojanje mostova između mikrotubula. Pokazano je da uklanjanjem kompleksa TACC3/ch-TOG/klatrin iz diobenog vretena dolazi do smanjenja broja mostova i destabilizacije k-vlakana. Na desnoj slici mikrotubuli su označeni zeleno, a mostovi narančasto. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 25.

Pokazano je da je ovaj kompleks moguće ukloniti iz diobenog vretena translokacijom na mitohondrije na vremenskoj skali od nekoliko minuta korištenjem metode naziva *knocksideways*.[24] Ova metoda koristi činjenicu da rapamicin uzrokuje dimerizaciju domena FKBP i FRB (engl. *FKBP and rapamycin-binding*) te omogućuje kemijski induciranu translokaciju proteina na mitohondrije.[27] Uklanjanje kompleksa TACC3/ch-TOG/klatrin iz metafaznog diobenog vretena uzrokovalo je destabilizaciju k-vlakana i gubitka tenzije između kinetohora, što je rezultiralo produljenjem trajanja perioda između metafaze i anafaze.[24]

Protein regulator citokineze 1, PRC1 (engl. *protein regulator of cytokinesis 1*) je član obitelji proteina Ase1p koji se veže na preklapajuće dijelove antiparalelnih mikrotubula *in vitro* (slika 7A)[28, 29] i u diobenom vretenu (slika 7B).[20, 30] Afinitet proteina PRC1 za vezanje mikrotubula reguliran je njegovom fosforilacijom i defosforilacijom. Na prijelazu iz metafaze u anafazu dolazi do defosforilacije proteina PRC1 što uzrokuje stvaranje dimera i povećava afinitet proteina za vezanje na mikrotubule.[30] Uloga proteina PRC1 dobro je karakterizirana u anafazi, kada je ovaj protein nužan za održavanje antiparalelnih svežnjeva mikrotubula između kromosoma.[30, 31] U metafazi, PRC1 je vezan na antiparalelne mikrotubule koji čine premošćujuće vlakno[18, 20]



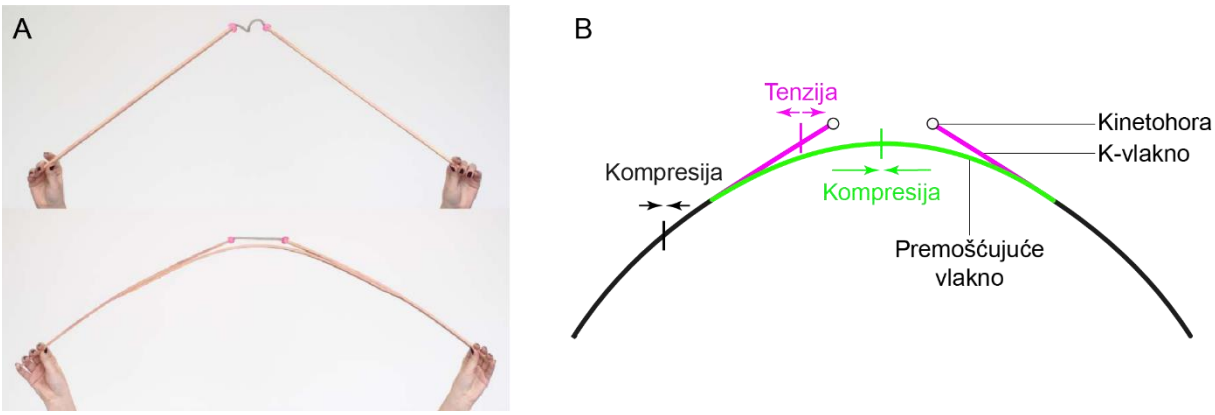
Slika 7. PRC1 veže antiparalelne mikrotubule *in vitro* (A) i u diobenom vretenu (B). Skala u slici A označava 10 μm, a vrijeme je dano kao min:s. Slika A preuzeta je i prilagođena prema ref 28.

2.3.3. Sile u diobenom vretenu

Djelovanje sila nužno je za održavanje oblika diobenog vretena, kao i za odvajanje kromosoma u anafazi. Iako su proteini koji čine diobeno vreteno i koji mogu generirati sile dobro poznati, još uvijek ne postoji jasna slika o tome kako djelovanje ovih proteina omogućuje održavanje oblika diobenog vretena i generiranje sila potrebnih za razdvajanje kromosoma.[2, 32]

Poznato je da između kinetohora u metafaznom diobenom vretenu postoji sila tenzije.[33-35] Postojanje tenzije između kinetohora potrebno je za prolazak kontrolne točke na prijelazu iz metafaze u anafazu i početak razdvajanja kromosoma.[36] Budući da u klasičnom modelu diobenog vretena samo k-vlakna generiraju sile na kinetohore, očekuje se da su i k-vlakna pod tenzijom zbog čega bi trebala biti ravna (slika 5A). Međutim, metafazno diobeno vreteno u većini stanica ima zaobljeni oblik (slike 1B i 7B). Ovakav oblik vretena ukazuje na to da su k-vlakna na vanjskom dijelu diobenog vretena pod utjecajem sile kompresije. Takvu pretpostavku potvrđuju i rezultati laserske ablacije u kojima nakon rezanja vanjskog k-vlakna slijedi njegovo izravnavanje i udaljavanje od glavne osi diobenog vretena.[18] Model diobenog vretena prema kojem su kinetohore pod tenzijom, a k-vlakna vezana na njih pod kompresijom predstavlja paradoks jer pretpostavlja istovremeno postojanje kompresije i tenzije u jednom mehaničkom elementu.[25] Međutim, ovakvi eksperimentalni rezultati mogu se objasniti

modelom koji uključuje postojanje premošćujućeg vlakna između sestrinskih k-vlakana. Ovaj model lakše je razumijeti korištenjem makroskopskog prikaza u slici 8A. U ovom prikazu drveni štapovi predstavljaju mikrotubule, ružičaste kuglice kinetohore, a uže između njih kromatin. U slučaju kad između štapova vezanih za kuglice ne postoji treći štap koji predstavlja premošćujuće vlakno (slika 8A, gore) štapovi su ravni, a uže između njih je opušteno. S druge strane, dodavanjem trećeg štapa može se postići zakrivljeni oblik štapova, uz istovremeno rastezanje užeta između njih (slika 8A, dolje). U ovom slučaju zakrivljeni štapovi predstavljaju mikrotubule pod kompresijom, a rastegnuto uže između njih pokazuje silu tenzije između kinetohora.[37] Dakle, opaženi eksperimentalni podatci mogu se objasniti modelom diobenog vretena prema kojem je sila tenzije između kinetohora uravnotežena postojanjem kompresije u premošćujućem vlaknu mikrotubula (slika 8B).[18, 37]



Slika 8. Premošćujući mikrotubuli omogućuju zaobljenost diobenog vretena. (A) Makroskopski model koji demonstrira raspodjelu sila u diobenom vretenu. Drveni štapovi predstavljaju mikrotubule, ružičaste kuglice kinetohore, a uže između njih kromatin. U slučaju kada postoje samo dva štapa (dva sestrinska k-vlakna) uže nije rastegnuto, a štapovi su ravni (gore). Dodavanjem trećeg štapa moguće je postići zakrivljenost štapova uz istovremeno rastezanje užeta. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 37 **(B)** Raspodjela sila u diobenom vretenu prema modelu koji uključuje postojanje premošćujućeg vlakna. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 18

2.4. Metode za inaktivaciju proteina

2.4.1. RNA interferencija

Do većine saznanja o ulogama proteina koji čine diobeno vreteno došlo se korištenjem metode RNA interferencije (RNAi) za utišavanje ekspresije proteina od interesa. RNA interferencija je pojava koja je prvo otkrivena u obliću *Caenorhabditis elegans*, a odnosi se na mogućnost malih molekula RNA da hibridizacijom s odgovarajućom mRNA spriječe njenu translaciju u protein. Ubrzo nakon otkrića ove pojave počelo je i njeno korištenje u eksperimentalne svrhe. Unošenjem siRNA (engl. *small interfering RNA*) koja hibridizira s mRNA koja kodira protein od interesa, moguće je specifično smanjiti ekspresiju proteina i na temelju opaženog fenotipa donositi zaključke o njegovoj ulozi. Takvu RNA moguće je unijeti u stanice koje rastu u kulturi izravno ili transfekcijom odgovarajućeg plazmida.[3]

Upotreba metode RNA interferencije dovela je do brojnih značajnih otkrića, ne samo u području stanične diobe već i općenito u staničnoj biologiji. Međutim, ova metoda djeluje na vremenskim skalama od nekoliko dana, što često dovodi do problema u interpretaciji opaženog fenotipa. Naime, uslijed smanjenja količine određenog proteina u stanici može doći do različite razine ekspresije nekih drugih proteina čime se nadoknađuje nedostatak utišanog proteina pa nije moguće opaziti značajnu promjenu fenotipa. Dodatni problemi pojavljuju se kod proučavanja mitoze kod koje određeni proteini mogu imati ulogu u više različitih procesa u razdoblju od nastanka diobenog vretena, preko njegovog održavanja, do konačnog razdvajanja kromosoma i nastanka dvije nove stanice. Na primjer, ukoliko neki protein sudjeluje u nastajanju diobenog vretena u prometafazi, nije moguće proučavati njegovu ulogu u kasnijim fazama mitoze jer RNA interferencija onemogućuje pravilno nastajanje diobenog vretena. Uz to, neki proteini imaju ulogu i u interfazi i u mitozi. Na primjer, klatrin za vrijeme mitoze sudjeluje u stabilizaciji k-vlakana diobenog vretena,[26, 38] dok u interfazi sudjeluje u staničnom transportu.[39]

2.4.2. Metode za brzu inaktivaciju proteina

Kao posljedica problema koji se pojavljuju u interpretaciji fenotipa uzrokovanog RNA interferencijom sve se više pojavljuju nove metode za inaktivaciju proteina. Idealna metoda trebala bi omogućavati inaktivaciju proteina na vremenskoj skali od nekoliko minuta. Uz to, metoda bi trebala biti specifična za određeni protein, ali istovremeno lako prilagodljiva za

inaktivaciju različitih proteina. Jako korisno svojstvo bilo bi i reverzibilnost metode, tj. mogućnost ponovne aktivacije proteina.

Jedna od dosad najčešće korištenih metoda je korištenje malih organskih molekula koje specifično inhibiraju određeni protein. Na primjer, monastrol inhibira motornu aktivnost kinezina-5.[40] Iako omogućuje inhibiciju proteina na vremenskim skalama od nekoliko sekundi, a često je ispiranjem inhibitora moguće postići i reverzibilnost, ova metoda ima i neke nedostatke. Metoda nije lako primjenjiva na različite proteine budući da je za svaki pojedini protein potrebno razviti novi inhibitor što zahtijeva puno vremena i mnogo rada. Uz to, inhibitori često nisu dovoljno selektivni pa mogu uzrokovati inhibiciju većeg broja proteina.

U poglavlju 2.3.2 spomenuta je i tzv. *knocksideways* metoda koja je korištena za uklanjanje proteina iz diobenog vretena translokacijom na mikrotubule.[24, 27] Ovakva indirektna inaktivacija ima prednost nad direktnom inhibicijom proteina jer je lako primjenjiva na veliki broj proteina. Uz to, metoda je vrlo specifična, a omogućuje potpuno uklanjanje proteina u nekoliko minuta. Međutim, ova metoda nije reverzibilna budući da je interakcija između FKBP i FRB do koje dolazi pod utjecajem rapamicina vrlo jaka.[27]

Metoda razvijena u ovom radu inspirirana je *knocksideways* metodom, ali se umjesto na kemijski induciranoj dimerizaciji temelji na dimerizaciji induciranoj svjetlom. Zbog toga će u sljedećem poglavlju biti dan pregled dostupnih optogenetičkih metoda koje omogućuju kontrolu dimerizacije proteina.

2.5. Optogenetičke metode

Pojam optogenetika definiran je kao kombinacija genetičkih i optičkih metoda s ciljem kontroliranja određenih događaja u specifičnim stanicama ili tkivima.[41] Optogenetičke metode svoje početke imaju u području neuroznanosti, gdje su korištene za kontrolu neuronske aktivnosti pomoću svjetla.[42] Međutim, danas se sve više koriste i u staničnoj biologiji, osobito u proučavanju staničnog transporta[6, 7] i signalizacije.[43, 44] Zbog velike primjene koju je ova metoda pronašla u različitim područjima znanosti, časopis *Nature Methods* proglasio je 2010. godine optogenetiku metodom godine.[41]

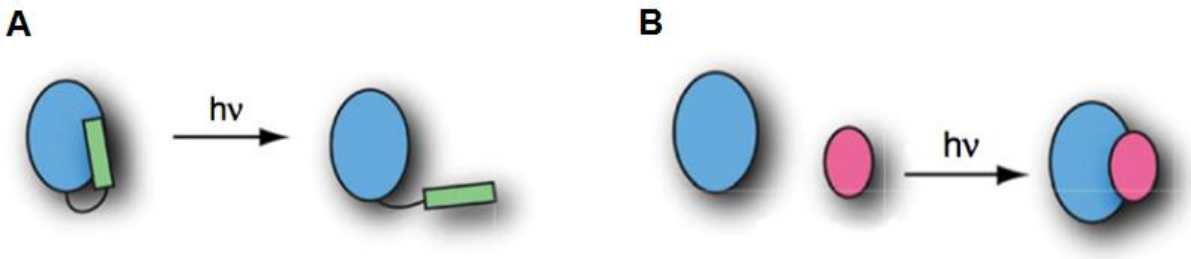
Korištenje svjetla omogućuje brzo, reverzibilno i precizno kontroliranje procesa u stanicama i tkivima od strane istraživača. Uz to, već postojeća široka primjena svjetlosne mikroskopije u staničnoj biologiji omogućuje jednostavnu primjenu ovih metoda, bez potrebe

za dizajnom novih eksperimentalnih postava. Zbog ovih razloga primjena metoda temeljenih na kontroli pomoću svjetla poprima sve veću popularnost. U prvim eksperimentima osjetljivost na svjetlo postizana je korištenjem malih organskih molekula osjetljivih na svjetlo.[45, 46] S druge strane, optogenetičke metode koriste genetički kodirane fotoreceptore koji se metodama genetičkog inženjerstva fuzioniraju s proteinima od interesa.[47, 48] Danas su česte i metode koje kombiniraju genetički pristup s organskom sintezom molekula osjetljivih na svjetlo.[49, 50]

2.5.1. Primjena optogenetičkih metoda u staničnoj biologiji

Kako je već navedeno, iako je razvoj optogenetičkih metoda počeo u području neuroznanosti, ove metode postaju sve popularnije i u proučavanju fundamentalnih procesa na razini stanice. Optogenetičke metode temelje se na korištenju različitih proteinskih domena koje mijenjaju konformaciju pod utjecajem svjetla određene valne duljine. Najčešće se koriste proteinske domene iz različitih fotosintetskih organizama, kojima se dodatnim mutacijama mijenjaju svojstva ovisno o potrebama eksperimenta. Do danas je otkriven velik broj fotosenzitivnih domena različitih svojstava, a među najčešće korištenima je LOV (engl. *Light-oxygen-voltage-sensing*) domena koja je osjetljiva na djelovanje plavog svjetla. Različite verzije ove domene pronađene su u brojnim biljkama, bakterijama, gljivama i algama.[51]

Domene osjetljive na svjetlo u staničnoj biologiji obično se koriste na jedan od dva načina prikazana na slici 9. U prvom načinu ove domene vežu se izravno na protein od interesa na način da promjena konformacije domene uzrokuje i promjenu u aktivnosti proteina (slika 9A). Drugi način kontrole pomoću svjetla je preko induciranja asocijacije proteina (slika 9B).[47]



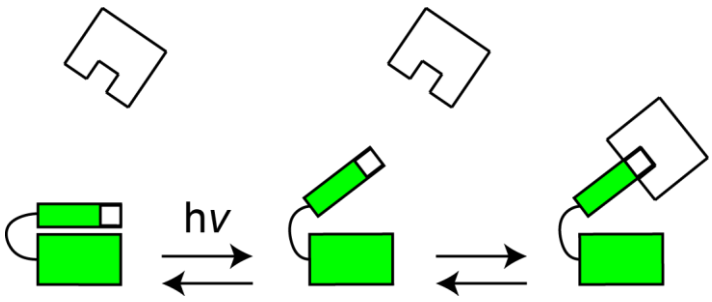
Slika 9. Dva načina korištenja optogenetičkih metoda za kontrolu aktivnosti proteina. (A) Izravna kontrola aktivnosti proteina. **(B)** Kontrola asocijacije proteina. Slika je preuzeta i prilagođena prema ref. 47

Prva metoda omogućuje kontrolu aktivnosti proteina na način da fotosenzitivna domena u jednoj od svojih konformacija uzrokuje alosteričku smetnju kojom se inaktivira protein od interesa. U drugoj konformaciji domena je udaljenija od proteina čime nestaje alosterička smetnja te je protein aktivan. Ova metoda uspješno je korištena za kontrolu aktivnosti malih GTPaza[4], kao i za kontrolu degradacije proteina[52] i vezanja proteina na DNA[53]. Međutim, nedostatak ove metode je da je za svaki pojedini protein potrebno odrediti optimalnu poziciju na koju treba vezati fotosenzitivnu domenu. Ovo je zadatak koji zahtijeva dugotrajan rad, a veliki broj proteina nije moguće kontrolirati na ovaj način. To je osobito slučaj kod proteina diobenog vretena koji često imaju nekoliko domena koje imaju različite funkcije. Na primjer, motorni proteini obično sadrže motornu domenu na jednom, a domenu koja omogućuje vezanje na mikrotubule na drugom kraju proteina.[3]

S druge strane, kontrolom asocijacije i disocijacije proteina (slika 9B) ne utječe se izravno na protein od interesa, već se kontrolom lokalizacije proteina postiže i kontrola njegove aktivnosti. Budući da je osnova metode razvijene u ovom radu dimerizacija inducirana svjetlom, ova tema bit će detaljnije obrađena u sljedećem poglavlju.

2.5.2. Dimerizacija inducirana svjetlom

Do danas su razvijeni brojni sustavi koji omogućuju kontrolu dimerizacije pomoću svjetla, kako oni bazirani na LOV domeni,[9, 54] tako i oni bazirani na biljnim fitokromima[5] i kriptokromima[8] ili fluorescentnim proteinima osjetljivima na svjetlo.[55] Pojedini sustavi razlikuju se na temelju valne duljine svjetlosti potrebne za aktivaciju te na temelju kinetike dimerizacije pod utjecajem svjetla, odnosno disocijacije do koje dolazi u mraku. Međutim, princip djelovanja svih metoda je sličan, a prikazan je na slici 10.



Slika 10. Shematski prikaz dimerizacije inducirane svjetlom. Prije djelovanja svjetla fotosenzitivna domena je u konformaciji koja onemogućuje dimerizaciju. Nakon djelovanja

svjetla određene valne duljine dolazi do promjene konformacije na način da je omogućeno stvaranje dimera. U mraku fotosenzitivna domena poprima početnu konformaciju te dolazi do disocijacije.

Dimerizacija inducirana svjetlom korištena je do sada za kontrolu brojnih staničnih procesa. Neki od primjera uključuju kontrolu transporta i lokalizacije staničnih organela,[6, 7] te kontrolu transkripcije gena[8] i signalizacije u stanici.[5, 43]

U ovom radu cilj je bio iskoristiti metodu dimerizacije inducirane svjetlom za brzo i reverzibilno uklanjanje proteina iz diobenog vretena translokacijom na mitohondrije. Idealan sustav za dimerizaciju u ovom slučaju trebao bi omogućavati dimerizaciju pod utjecajem svjetla na vremenskim skalama od nekoliko sekundi. Uz to, disocijacija proteina s mitohondrija nakon gašenja svjetla trebala bi se događati u nekoliko minuta, kako bi se protein mogao brzo vratiti na diobeno vreteno. Vrlo bitno je i da svjetlo potrebno za pobuđivanje fluorescentnih proteina korištenih za vizualizaciju proteina od interesa ne uzrokuje aktivaciju dimerizacije. Uz to, nužno je da se proteini koji čine sustav za induciranu dimerizaciju mogu eksprimirati u ljudskim tumorskim stanicama korištenima u istraživanju, bez da takva ekspresija utječe na funkciju stanice. Pregledom dostupnih sustava za dimerizaciju zaključeno je da ove uvjete zadovoljava sustav iLID (engl. *improved Light-Inducible Dimer*). Ovaj sustav temelji se na fotosenzitivnoj LOV2 domeni iz biljke *Avena sativa* te na dimerizaciji proteina SspB i peptida SsrA iz bakterije *Escherichia coli*.[9] Peptid SsrA je privjesak od 11 aminokiselina koji se u *E. Coli* dodaje na kraj polipeptida u slučaju kad dolazi do problema u translaciji mRNA.[56] Ovako obilježeni polipeptidi degradiraju se pomoću proteaza, a u prepoznavanju ovog privjeska sudjeluje adaptorski protein SspB.[57]

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Dizajn i konstrukcija plazmida

Kako bi bilo moguće eksprimirati protein od interesa označen s fluorescentnim proteinom i SspB proteinom u ljudskim stanicama, konstruirani su odgovarajući plazmidi. Kloniranje kodirajućeg slijeda u odgovarajući vektor provedeno je korištenjem komercijalno dostupnog kompleta *In-Fusion HD Cloning Kit* (Clontech, Mountain View, CA, SAD). Glavna komponenta ovog sustava je *In-Fusion* enzim koji ugrađuje fragment DNA u vektor na temelju postojanja slijeda od oko 15 parova baza na krajevima fragmenta, komplementarnog krajevima lineariziranog vektora.[58] Za dizajn početnica korišten je program SnapGene (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, SAD). U ovom radu konstruirani su sljedeći plazmidi:

pBrain-tgRFPt-SspB-WT-TACC3KDP-shTACC3: Plazmid je konstruiran ugradnjom kodirajućeg slijeda za crveni fluorescentni protein tgRFPt (engl. *Tag red fluorescent protein T*) i protein SspB u plazmid pBrain-GFP-TACC3KDP-shTACC3 između restrikcijskih mjesta *Nhe*I i *Bsr*GI. Plazmid omogućuje ekspresiju proteina TACC3 obilježenog proteinima tgRFPt i SspB na N-kraju. Uz to, plazmid nosi gen za ekspresiju shRNA (engl. *short hairpin RNA*) koja degradira endogeni protein prisutan u stanici, dok je TACC3KDP (engl. *knockdown-proof*) eksprimiran s plazmida otporan na djelovanje ove shRNA.

PRC1-tgRFPt-SspB-WT: Plazmid je konstruiran ugradnjom kodirajućeg slijeda za protein PRC1 u plazmid tgRFPt-SspB WT koji je lineariziran restrikcijskim enzimom *Age*I. Plazmid omogućuje ekspresiju proteina PRC1 obilježenog proteinima tgRFPt i SspB na C-kraju.

ptgRFPt-SspB-WT-KIF18a: Plazmid je konstruiran ugradnjom kodirajućeg slijeda za crveni fluorescentni protein tgRFPt i protein SspB u plazmid pMX229 između restrikcijskih mjesta *Nhe*I i *Bsr*GI. Plazmid omogućuje ekspresiju proteina KIF18a obilježenog proteinima tgRFPt i SspB na N-kraju.

Mape navedenih plazmida prikazane su na slici 11.



Slika 11. Shematski prikaz konstruiranih plazmida.

Plazmidi koji su bili dostupni iz prethodnih radova, a korišteni u ovom radu prikazani su u tablici 1. Navedeni plazmidi kupljeni su od dobavljača Addgene (Cambridge, MA, SAD).

Tablica 1. Plazmidi korišteni u ovom radu

Naziv plazmida	***Addgene* broj**	**Referenca**
pBrain-GFP-TACC3KDP-shTACC3	59356	Ref. 23
His6-PRC1	9111	Ref. 25
pMX229	23002	Ref. [59]
tgRFPt-SspB WT	60415	Ref. 9
Venus-iLID-Mito	60413	Ref. 9

3.1.1. Umnažanje kodirajućih sljedova pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR)

Sekvence početnica korištenih u ovom radu prikazane su u tablici 2. Sve početnice kupljene su od proizvođača Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska).

Tablica 2. Nukleotidne sekvence početnica korištenih za umnažanje ciljnih sljedova

Naziv početnice	**Sekvenca (5'→3')**
tgRFPt-SSPBF	CGTCAGATCCGCTAGCATGGTGTCTAAGGGCGAAGAG
tgRFPt-SSPBR	AGTCCGGACTTGTACACACCAATATTCA GCTCGTCATAGATTTCT
PRC1-RFP-SSPB-F	GCTAGAATTGACCGGATGAGGAGAAGTGAGGTGCTG
PRC1-RFP-SSPB-R	CATGGTGGCGACCGGTAAATTCGAAGCTTGAGCTCGA GATCTGAGGGACTGGATGTTGGTTGAATTGAGG

Početnice tgRFPt-SSPBF i tgRFPt-SSPBR korištene su za umnažanje kodirajućeg slijeda za crveni fluorescentni protein tgRFPt i protein SspB. Kao kalup u toj reakciji korišten je plazmid tgRFPt-SspB WT.

Početnice PRC1-RFP-SSPB-F i PRC1-RFP-SSPB-R korištene su za umnažanje kodirajućeg slijeda za protein PRC1. Kao kalup u toj reakciji korišten je plazmid His6-PRC1.

Za sve PCR reakcije u kojima je cilj bio umnožiti kodirajući slijed korištena je komercijalno dostupna smjesa za PCR - *CloneAmp HiFi PCR Premix* (Clontech). Sastav smjese za PCR određen je prema uputama proizvođača, a dan je u tablici 3. Postav provedenih PCR reakcija prikazan je u tablici 4.

Tablica 3. Sastav smjese za PCR

Reagens	**Količina**
CloneAmp HiFi PCR Premix	12,5 μL
Početnica 1	7,5 pmol
Početnica 2	7,5 pmol
Kalup	1 ng
ReH_2O	do 25 μL

Tablica 4. Postav PCR-a za umnažanje kodirajućeg slijeda

	Temperatura / °C		**Trajanje ciklusa**		**Broj ciklusa**
	tgRFPt-SspB	PRC1	tgRFPt-SspB	PRC1	
Početna denaturacija	98	98	1 min	3 min	1
Denaturacija	98	98	10 s	10 s	35
Sparivanje početnica	57	58	15 s	15 s	35
Produljenje	72	72	7 s	10 s	35
Završno produljenje	72	72	7 min	7 min	1

3.1.2. Priprema agaroznog gela i pročišćavanje PCR-produkta

Uspješnost provedenih PCR reakcija provjerena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Agarozni gelovi pripremljeni su otapanjem 0,5 g agaroze u 50 mL TAE pufera sastava Tris (c = 40 mmol/dm^3), octena kiselina (c = 20 mmol/dm^3), EDTA (c = 1 mmol/dm^3, pH = 8,0). Smjesa je ohlađena na oko 60 °C, u nju je dodano 5 μL boje *GelStar Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, Bazel, Švicarska) te je otopina izlivena u pripremljenu kadicu u kojoj su se nalazili češljevi s utorima.

Nakon provedenog PCR-a, iz reakcijske smjese odvojeno je 10 μL uzorka u koji je dodano 2 μL boje *Gel loading dye* (New England BioLabs, Hertfordshire, UK). Tako

pripremljena smjesa nanesena je u jažicu na gelu. Kako bi bilo moguće procijeniti veličinu dobivenog PCR-fragmenta, na gel je naneseno i 10 μL standarda veličine *Quick-Loading 1kb DNA ladder* (New England BioLabs). Elektroforeze su provođene u trajanju od 20-40 min pri 80 V. Za vizualizaciju fluorescentne boje nakon provedene elektroforeze korišten je uređaj UVIDOC HD6 (Uvitec, Cambridge, UK).

Za pročišćavanje PCR produkata korišten je komercijalno dostupan komplet *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Clontech) prema uputama proizvođača.

3.1.3. Linearizacija i pročišćavanje plazmida

Plazmidi su linearizirani razgradnjom restrikcijskim enzimima. Svi restrikcijski enzimi, kao i pripadajući puferi kupljeni su od proizvođača New England BioLabs.

Za linearizaciju plazmida pBrain-GFP-TACC3KDP-shTACC3 i pMX229 korišteni su enzimi *Nhe*I-HF i *Bsr*GI-HF. Smjesa za razgradnju sastojala se od 5 μg plazmida, po 4 μL svakog restrikcijskog enzima, 5 μL *CutSmart* pufera i ReH_2O do 50 μL. Restrikcija je provođena 3 h na 37 °C. Na ovaj način iz navedenog plazmida izrezan je gen za GFP. Nakon razgradnje provedena je agarozna gel elektroforeza kako bi se linearizirani plazmid odvojio od GFP-a. Elektroforeza je provođena 1 sat pri 80 V, nakon čega je dio gela u kojem se nalazio linearizirani vektor izrezan. Linearizirani vektor pročišćen je iz gela korištenjem kompleta *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* prema uputama proizvođača.

Plazmid tgRFPt-SspB WT linearizirani je razgradnjom s restrikcijskim enzimom *Age*I-HF. Smjesa za razgradnju sastojala se od 2,5 μL plazmida (γ=2 μg/μL), 5 μL restrikcijskog enzima, 5 μL *CutSmart* pufera i 38,5 μL ReH_2O. Restrikcija je provođena 45 minuta na 37 °C. Nakon linearizacije plazmid je pročišćen korištenjem kompleta *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* prema uputama proizvođača.

3.1.4. In-Fusion reakcija

Za ugradnju generiranog PCR-produkta u linearizirani vektor korišten je komercijalno dostupan komplet *In-Fusion HD Cloning Kit*. Smjesa za *In-Fusion* reakciju sastojala se od 100 ng inserta, 100 ng linearizirano vektora, 2 μL smjese *In-Fusion HD Enzyme Premix* i ReH_2O do 10 μL. Reakcija je provođena 15 minuta na 50 °C. Kao negativna kontrola reakcije korištena je smjesa u koju su dodani svi sastojci osim PCR-produkta.

3.1.5. Transformacija bakterija

Nakon provedene *In-Fusion* reakcije smjesa je transformirana u kemijski kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* (Stellar Competent Cells, Clontech). Transformirano je 100 μL bakterija s 5 μL smjese prema uputama proizvođača. Bakterije su nakon transformacije i inkubacije nasađene na ploče s krutom hranjivom podlogom koja je sadržavala LB medij i odgovarajući antibiotik (kanamicin u koncentraciji 30 μg/mL za plazmide pBrain-tgRFPt-SspB-WT-TACC3KDP-shTACC3 i ptgRFPt-SspB-WT-KIF18a, odnosno ampicilin u koncentraciji 100 μg/mL za plazmid tgRFPt-SspB-WT-PRC1). Stanice transformirane smjesom u kojoj su se nalazili plazmid i insert nasađene su na dvije ploče. Na prvu ploču nasađeno je 100 μL transformacijske smjese, a na drugu ostatak smjese. Na treću je ploču naneseno 100 μL stanica transformiranih kontrolnom smjesom. Ploče su inkubirane preko noći na 37 °C.

3.1.6. PCR na kolonijama

Kako bi se identificirale kolonije koje sadrže željeni plazmid na kolonijama koje su preko noći narasle na hranjivim podlogama napravljen je kolonijski PCR. Za provođenje PCR-a korišteni su *Taq*-polimeraza, dNTP-ovi i pufer iz komercijalno dostupnog paketa za PCR *Taq DNA Polymerase dNTPack* (Roche, Mannheim, Njemačka) te početnice korištene za umnažanje kodirajućih sljedova. Prema uputama proizvođača pripremljene su dvije *master mix* smjese čiji su sastavi dani u tablicama 5 i 6.

Tablica 5. *Master mix 1* za PCR na kolonijama

Komponenta	**Početna koncentracija**	**Volumen / μL**
Početnica 1	100 pmol/μL	1,75
Početnica 2	100 pmol/μL	1,75
PCR Grade Nucleotide Mix	10x	7
ReH_2O	-	164,5

Tablica 6. *Master mix 2* za PCR na kolonijama

Komponenta	Početna koncentracija	Volumen / μL
PCR reaction buffer	10x	35
Taq-DNA-polimeraza	5 U/μL	1,75
ReH_2O	-	138,25

Po 10 μL *master mix 1* smjese raspipetirano je u 15 epruveta za PCR te je odabrano i označeno 15 kolonija na ploči. Za svaku od odabranih kolonija proveden je sljedeći postupak: kolonija je upiknuta nastavkom za automatsku mikropipetu te je razmazana po krutoj hranjivoj podlozi s odgovarajućim antibiotikom, a dio kolonije koji je ostao na nastavku resuspendiran je u 10 μL *master mix 1* smjese. Nakon toga u epruvete je dodano po 10 μL smjese *master mix 2* te je proveden PCR pri uvjetima opisanima u tablici 7.

Tablica 7. Postav PCR-a na kolonijama

	Temperatura / °C		**Trajanje ciklusa**		**Broj ciklusa**
	tgRFPt-SspB	PRC1	tgRFPt-SspB	PRC1	
Početna denaturacija	95	95	10 min	10 min	1
Denaturacija	95	95	30 s	30 s	30
Sparivanje početnica	57	58	30 s	30 s	30
Produljenje	72	72	70 s	70 s	30
Završno produljenje	72	72	5 min	5 min	1

Rezultati kolonijskog PCR-a provjereni su agaroznom gel elektroforezom na način opisan u poglavlju 3.1.2.

3.1.7. Izolacija rekombinantnog plazmida

Nakon što su kolonijskim PCR-om identificirane kolonije koje sadrže željeni plazmid, plazmid je izoliran korištenjem kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka). Konačna provjera ispravnosti kloniranja provedena je sekvenciranjem otvorenog okvira čitanja izoliranog plazmida u DNA-servisu tvrtke Macrogen. Nakon potvrde

ispravnosti kloniranja, plazmidi su izolirani u većoj količini potrebnoj za transfekciju stanica, a za to je korišten komplet *HiSpeed Plasmid MaxiKit* (Quiagen).

3.2. Stanična kultura

3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice U2OS uzgajane su u DMEM mediju (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Bazel, Švicarska) u koji je dodano 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a (engl. *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 50 μg/mL geneticina (Life Technologies, Waltham, MA, SAD), 100 I.U./mL penicilina (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i 100 μg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich). Stanice su uzgajane na 37 °C i 5% CO_2 u inkubatoru *Galaxy 170S* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

3.2.2. Transfekcija plazmidne DNA i siRNA

Za transfekciju plazmida i siRNA korišten je komplet *Nucleofector Kit R* i uređaj *Nucleofector 2b* (Lonza) na kojem je odabran program X-001. Za transfekciju su korištene stanice koje su dosegle konfluentnost od 80-90%. Stanice su transfecirane s 1 μL plazmida Venus-iLID-Mito (γ=0,43 μg/μL) te 0,7 μL pBrain-tgRFPt-SspB-WT-TACC3KDP-shTACC3 (γ=0,70 μg/μL) ili 4 μL ptgRFPt-SspB-KIF18a (γ=0,50 μg/μL) ili 20 μL tgRFPt-SspB-WT-PRC1 (γ=0,33 μg/μL). Transfecirano je 10^6 stanica prema uputama proizvođača, nakon čega su stanice nasađene u dvije posudice za mikroskopiranje. Stanice su mikroskopirane 24 h ili 48 h nakon transfekcije.

U eksperimentima u kojima je cilj bio ukloniti endogeno prisutan protein PRC1 stanice su transfecirane sa siRNA koja prepoznaje 3'-netranslatiranu regiju odgovarajuće mRNA. Na ovaj način degradirana je mRNA samo endogeno prisutnog PRC1, a ne i ona prepisana s plazmida, budući da se na plazmidu nalazi samo kodirajući slijed. Korištena je *Accell PRC1 siRNA* (A-019491-15-0020, Dharmacon, Lafayette, CO, SAD), a kao kontrola *Accell Non-targeting Pool* (D-001910-10-05, Dharmacon). Za transfekciju je korišteno 1 μL siRNA (c=100 μmol/L), a transfekcija siRNA provedena je istovremeno s transfekcijom plazmidne DNA.

3.2.3. Priprema stanica za mikroskopiranje

Nakon provedene transfekcije stanice su nasađene u posudice za mikroskopiranje koje imaju staklo promjera 35 mm i debljine 1,5 mm (MatTek Corporation, Ashland, SAD) u kojima se nalazilo 1,5 mL DMEM medija. Oko 3 h prije mikroskopiranja, DMEM medij zamijenjen je L-15 (Leibovitz) medijem za mikroskopiranje (Life Technologies). U L-15 medij prethodno je dodano 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 50 μg/mL geneticina, 100 I.U./mL penicilina i 100 μg/mL streptomicina.

U eksperimentima u kojima je bilo potrebno vizualizirati mikrotubule, provedeno je bojanje tubulina bojom SiR-tubulin (Spirochrome AG, Stein am Rhein, Švicarska) u koncentraciji od 100 nmol/L, uz dodatak inhibitora staničnih pumpi verapamila u koncentraciji 1 μmol/L čime je spriječeno izbacivanje boje iz stanica.

3.2.4. Imunocitokemija

Kako bi se odredila učinkovitost degradacije endogenog proteina PRC1 RNA interferencijom, provedeno je imunokemijsko bojanje koje omogućuje vizualizaciju endogenog proteina prisutnog u stanicama. Nakon provedene transfekcije sa siRNA i inkubacije stanica u trajanju od 24 h ili 48 h, stanice su fiksirane dodatkom 1 mL 100% metanola na 2 minute. Metanol je zatim ispran s tri ispiranja s 1 mL PBS pufera (engl. *Phosphate-Buffered Saline*) uz lagano potresanje u trajanju od po 5 minuta. Permeabilizacija stanične membrane provedena je inkubacijom stanica u 1 mL 0,5% otopine tritona u PBS-u. Stanice su najprije inkubirane 15 minuta uz lagano potresanje na sobnoj temperaturi, zatim je otopina tritona isprana s tri ispiranja PBS puferom u trajanju od po 5 minuta. Nakon toga opet je provedena inkubacija u otopini tritona u trajanju od 20 minuta uz lagano potresanje na sobnoj temperaturi, nakon čega je provedeno ispiranje PBS puferom. Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela stanice su inkubirane u 1 mL 1% otopine NGS-a (engl. *Normal Goat Serum*) u PBS puferu. Inkubacija je provedena u trajanju od 1 h, uz lagano potresanje na 4 °C. Nakon inkubacije stanice su isprane s 3 ispiranja PBS puferom te je dodano 250 μL otopine primarnog antitijela specifičnog za PRC1 (H-70; sc-8356, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD) u 1% otopini NGS-a u PBS-u (γ=4 μg/mL). Stanice su inkubirane u otopini primarnog antitijela 42 h, uz lagano potresanje na 4 °C. Nakon inkubacije stanice su isprane s 3 ispiranja PBS puferom te je dodano 250 μL otopine sekundarnog antitijela (Alexa Fluor-405 F-conjugated

goat anti-rabbit IgG; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u 2% otopini NGS-a u PBS-u (γ=4 μg/mL). Posudice za mikroskopiranje pokrivene su aluminijskom folijom kako bi se zaštitile od svjetla te je provedena inkubacija u trajanju od 1 h uz lagano potresanje na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije stanice su isprane s 3 ispiranja PBS puferom. Kako bi se vizualizirali kromosomi, 15 minuta prije mikroskopiranja dodano je 1 mL otopine boje SiR-DNA (Spirochrome AG) u PBS puferu u koncentraciji od 0,5 μmol/L.

3.3. Svjetlosna mikroskopija i aktivacija svjetlom

Za snimanje stanica korišten je konfokalni mikroskop *Bruker Opterra Multipoint Scanning Confocal Microscope* (Bruker Nano Surfaces, Middleton, WI, SAD). Ovaj sustav montiran je na Nikon Ti-E inverzni mikroskop opremljen uljnim imerzijskim objektivom Nikon CFI Plan Apo VC 100x/1.4 (Nikon, Tokio, Japan). Sustav je kontroliran pomoću programa PraireView 5.4 (Bruker). Za pobuđivanje fluorescencije fluorescentnog proteina tgRFPt i boje SiR-tubulin korišteni su diodni laseri valne duljine 561 nm, odnosno 640 nm. Za aktivaciju iLID sustava korišten je laser valne duljine 488 nm koji je također pobuđivao fluorescenciju žutog fluorescentnog proteina Venus. U svim eksperimentima snimano je 5 ravnina s razmakom između susjednih ravnina od 0,5 μm. Vrijeme ekspozicije iznosilo je 100 ms, a tijekom snimanja korištena je točkasta apertura veličine 60 μm. Emitirano svjetlo detektirano je kamerom Evolve 512 Delta (Photometrics, Tucson, AZ, SAD). Veličina piksela u svim slikama iznosi 83 nm. Za održavanje temperature na 37 °C tijekom snimanja korištena je komora za zagrijavanje H301-K-frame (Okolab, Pozzuoli, Italija).

3.3.1. Postavke za snimanje stanica koje eksprimiraju Venus-iLID-Mito i tgRFPt-SspB-TACC3 ili tgRFPt-SspB-KIF18a

U eksperimentima korištenima za analizu kinetike uklanjanja proteina TACC3 s diobenog vretena stanice su snimane svakih deset sekundi. Za pobuđivanje fluorescencije fluorescentnog proteina tgRFPt korišten je laser valne duljine 561 nm. U prvih 30 sekundi snimanja laser na valnoj duljini 488 nm nije bio upaljen pa optogenetički sustav nije bio aktiviran. Nakon toga je navedeni laser upaljen čime je aktiviran iLID sustav te je snimanje nastavljeno još 200 sekundi. Zatim je plavo svjetlo opet ugašeno te je stanica snimana još 700 sekundi. U ovim eksperimentima je za blokiranje svjetla korištenog za pobudu fluorofora korišten set filtera *Opterra Dichroic and Barrier Filter Set 405/488/561/640.*

3.3.2. Postavke za snimanje stanica koje eksprimiraju Venus-iLID-Mito i PRC1-tgRFPt-SspB

U eksperimentima s uklanjanjem proteina PRC1 najprije je snimljena jedna kontrolna snimka korištenjem lasera na valnim duljinama 561 nm i 640 nm, bez paljenja lasera valne duljina 488 nm. Zatim je svakih 60 sekundi snimljeno 5 ravnina u svakom od tri kanala. Budući da je u ovim eksperimentima vremenski interval iznosio 60 sekundi, postojala je mogućnost da dođe do disocijacije proteina s mitohondrija između dva snimanja. Kako bi se to spriječilo u stanci između dva snimanja tri puta je upaljeno plavo svjetlo u vremenskim intervalima od 20 sekundi. Stanice su na ovaj način snimane 8-15 minuta, nakon čega je plavo svjetlo ugašeno te je snimanje nastavljeno još 10-15 minuta u vremenskim intervalima od 60 sekundi. Tijekom snimanja korišteni su emisijski filteri BL HC 525/30 za Venus, BL HC 600/37 za tgRFPt i BL HC 673/11 za SiR-tubulin (svi filteri kupljeni su od proizvođača Semrock, Rochester, NY, SAD).

3.3.3. Postavke za snimanje stanica nakon provedene imunocitokemije

Za pobuđivanje fluorescencije sekundarnog antitijela Alexa Fluor-405 korišten je laser valne duljine 405 nm, a za pobuđivanje fluorescencije boje SiR-DNA laser valne duljina 640 nm. Za blokiranje svjetla korištenog za pobudu fluorofora korišten je set filtera *Opterra Dichroic and Barrier Filter Set 405/488/561/640.*

3.4. Analiza snimaka i kvantifikacija podataka

Analiza snimaka napravljena je u programu ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, SAD). Za kvantifikaciju podataka i generiranje grafičkih prikaza korišten je MatLab (MathWorks, Natick, SAD). Završno uređivanje slika napravljeno je u programu Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, Mountain View, CA, SAD).

3.4.1. Analiza kinetike uklanjanja proteina TACC3

Srednja vrijednost intenziteta fluorescencije tgRFPt u diobenom vretenu izmjerena je u programu ImageJ korištenjem alata *Polygon selection* na način prikazan na slici 16. Intenziteti su normalizirani dijeljenjem s intenzitetom u t=0 s. Za određivanje kinetičkih parametara provedena je nelinearna regresija na normaliziranim podatcima. Nelinearna regresija

provedena je korištenjem *Curve Fitting* opcije u MatLabu. U regresiji je korištena metoda najmanjih kvadrata, a za rješavanje normalnih jednadžbi korišten je Levenberg-Marquardt algoritam. Kao početne vrijednosti parametara I_0 i I_∞ korištene su eksperimentalno određene vrijednosti intenziteta na početku, odnosno na kraju eksperimenta. Za određivanje kinetike povratka proteina na diobeno vreteno korišteni su podatci u prvih 200 s nakon gašenja plavog svjetla, budući da nakon tog vremena počinje značajniji gubitak signala uzrokovan dugotrajnim snimanjem.

3.4.2. Analiza intenziteta PRC1 i tubulin signala u diobenom vretenu

Profili intenziteta signala tgRFPt i SiR tubulina određeni su korištenjem alata *Line tool* u programu ImageJ. Linija je nacrtana okomito na glavnu os diobenog vretena, na način da ne zahvaća dijelove diobenog vretena na koje su tijekom eksperimenta translocirani mitohondriji. Duljina linije iznosila je 94 piksela, a širina 6 piksela.

3.4.3. Analiza oblika i veličine diobenog vretena

Analiza oblika i veličine diobenog vretena napravljena je na način da su najprije u programu ImageJ određene koordinate vanjske konture diobenog vretena korištenjem alata *Multi-point tool*. Iz ovih podataka određene su duljina i širina diobenog vretena. Kako bi se odredio kut Θ između sestrinskih k-vlakana, provedena je linearna regresija na tri točke na završetku svakog k-vlakna, a kut Θ određen je kao kut između dobivenih pravaca.

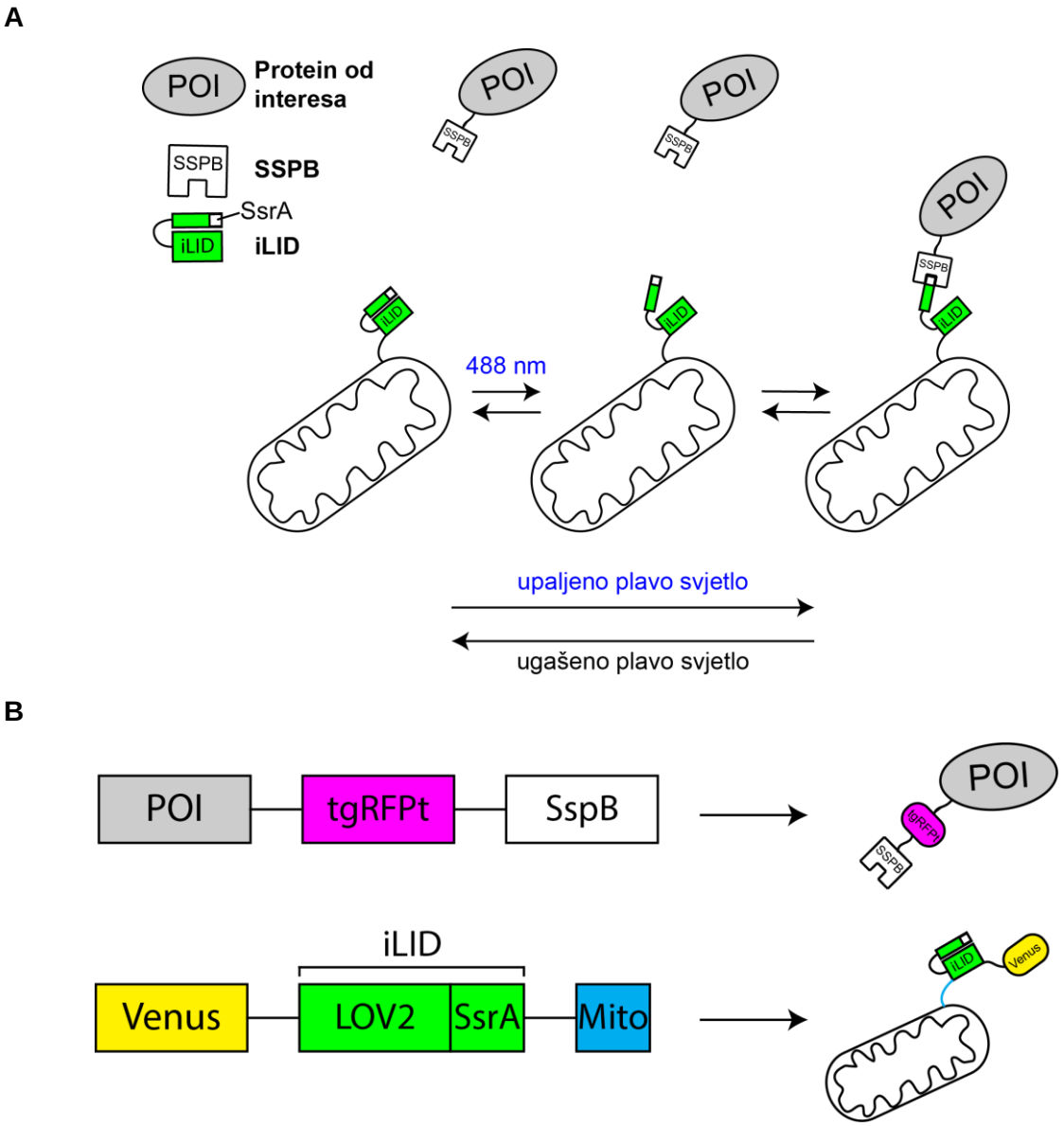
U svim *box plot* prikazima crna horizontalna linija označava medijan, sivi pravokutnik označava dio između prvog i trećeg kvartila, a isprekidana linija označava minimalnu, odnosno maksimalnu vrijednost. Znakom plus označeni su *outlieri* koji su određeni kao podatci veći od $q_3 + 1{,}5 \cdot (q_3 - q_1)$ ili manji od $q_1 - 1{,}5 \cdot (q_3 - q_1)$, gdje su q_1 i q_3 prvi, odnosno treći kvartil. Za određivanje statističke signifikantnosti promjena parametara korišten je dvosmjerni Wilcoxonov test za uparene uzorke.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Prikaz razvijene optogenetičke metode

Cilj ovog rada bio je razviti metodu koja bi omogućavala brzu i reverzibilnu inaktivaciju proteina diobenog vretena korištenjem svjetla. Budući da bi razvijena metoda trebala biti lako primjenjiva na veliki broj različitih proteina, odabran je pristup koji ne uključuje izravnu inaktivaciju proteina, već omogućuje translokaciju proteina s diobenog vretena na mitohondrije. U tu svrhu korišten je prethodno razvijen sustav za dimerizaciju induciranu svjetlom naziva iLID (engl. *improved Light-Inducible Dimer*).[9] Ovaj sustav omogućuje kontrolu dimerizacije proteina SspB i peptida SsrA iz *E. coli* korištenjem plavog svjetla. Osjetljivost sustava na svjetlo temelji se na LOV2 domeni iz biljke *A. sativa*, koja mijenja konformaciju pod utjecajem plavog svjetla.

Shematski prikaz načina rada ovdje razvijene metode dan je na slici 12A. Na protein od interesa vezan je protein SspB. Protein iLID, koji je dizajniran fuzijom SsrA peptida i LOV2 domene, vezan je za mitohondrij preko kratke peptidne sekvence. Kad sustav nije izložen plavom svjetlu konformacija LOV2 domene je takva da onemogućuje dimerizaciju peptida SsrA i proteina SspB. Pod utjecajem plavog svjetla dolazi do promjene konformacije LOV2 domene čime je omogućena dimerizacija. Budući da je protein SspB vezan za protein od interesa, inducirana dimerizacija trebala bi uzrokovati translokaciju proteina s diobenog vretena na mitohondrije. Nakon gašenja plavog svjetla smanjuje se afinitet proteina iLID za SspB što uzrokuje disocijaciju proteina SspB i za njega vezanog proteina od interesa s mitohondrija. Nakon disocijacije s mitohondrija protein od interesa može se ponovno vezati na diobeno vreteno (slika 12A). Shematski prikazi fuzijskih proteina koje je potrebno eksprimirati u stanici kako bi se ova metoda mogla provesti te kako bi se mogli pratiti rezultati dani su na slici 12B. Valja napomenuti da će primjenjivost ove metode ovisiti o afinitetu vezanja proteina na diobeno vreteno. Naime, ukoliko je ispitivani protein dinamičan te brzo disocira i ponovno asocira s mikrotubulima diobenog vretena, bit će ga moguće ukloniti u kratkom vremenu. S druge strane, proteini koji se čvrsto vežu na diobeno vreteno neće se moći ukloniti na ovaj način.



Slika 12. Shematski prikaz načina rada razvijene metode. (A) Pod utjecajem plavog svjetla dolazi do konformacijske promjene u LOV2 domeni proteina iLID čime je omogućena dimerizacija proteina iLID i proteina SspB. Ukoliko je protein SspB vezan na protein od interesa iz diobenog vretena, trebalo bi doći do translokacije proteina iz diobenog vretena na mitohondrije. Nakon gašenja plavog svjetla protein od interesa disocira s mitohondrija te se može ponovno vezati na diobeno vreteno. **(B)** Shematski prikaz fuzijskih proteina koje je potrebno eksprimirati u stanici. Za protein od interesa je, uz SspB protein, vezan i crveni fluorescentni protein (tgRFPt) čime je omogućena njegova vizualizacija. Protein iLID sastoji se od LOV2 domene i peptida SsrA, a za njega su vezani žuti fluorescentni protein (Venus) i kratka peptidna sekvenca koja omogućuje vezanje na vanjsku membranu mitohondrija (Mito).

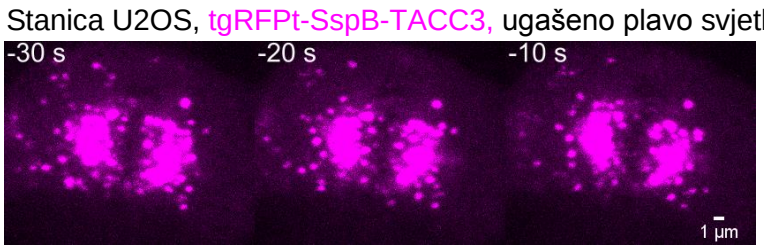
4.2. Uklanjanje proteina TACC3 iz diobenog vretena

4.2.1. Razvijena metoda omogućuje brzo i reverzibilno uklanjanje proteina TACC3 iz diobenog vretena

Kao prvi protein diobenog vretena na kojem je ispitana učinkovitost uklanjanja dimerizacijom induciranom svjetlom odabran je protein TACC3. Razlog ovog odabira je u tome što je prethodno pokazano da je ovaj protein moguće ukloniti translokacijom na mitohondrije, u eksperimentima u kojima je korištena kemijski inducirana dimerizacija.[24] TACC3 se u diobenom vretenu nalazi u kompleksu s ch-TOG i klatrinom. TACC3-ch-TOG-klatrin kompleks ima ulogu u održavanju stabilnosti k-vlakana na način da povezuje paralelne mikrotubule unutar k-vlakna.[23, 25, 38]

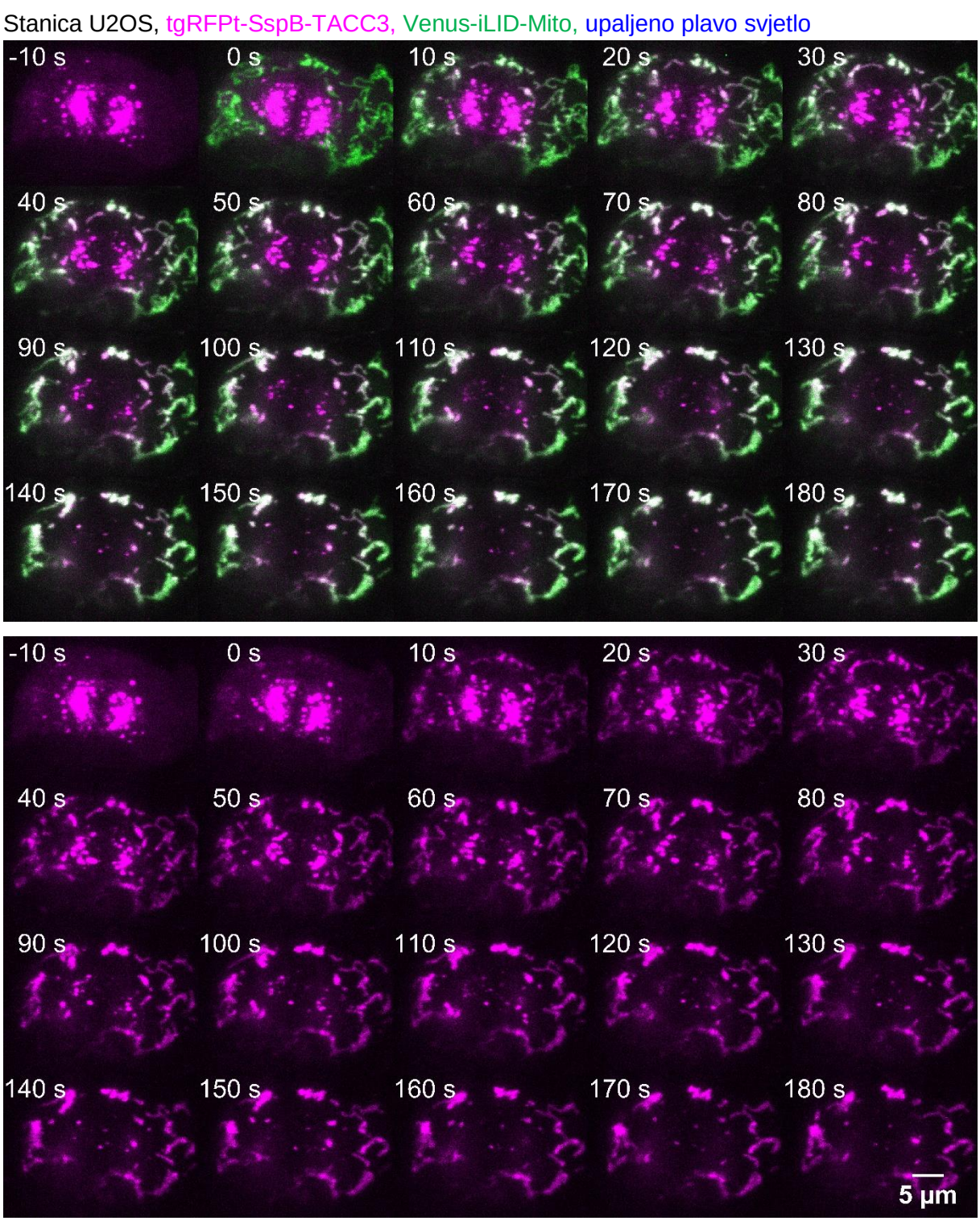
Kako bi se odredilo omogućava li ovdje razvijena metoda reverzibilno uklanjanje proteina TACC3 iz diobenog vretena, stanice U2OS transfecirane su plazmidima pBrain-tgRFPt-SspB-WT-TACC3KDP-shTACC3 i Venus-iLID-Mito. Prvi plazmid omogućuje ekspresiju proteina TACC3 obilježenog crvenim fluorescentnim proteinom tgRFPt i proteinom SspB. Osim toga, ovaj plazmid istovremeno uklanja endogeno prisutan TACC3 ekspresijom odgovarajuće shRNA. Eksprimirana shRNA neće uzrokovati degradaciju TACC3 s plazmida jer je u kodirajući slijed ugrađeno nekoliko tihih mutacija koje ga čine otpornim na djelovanje shRNA.[23] Drugi plazmid omogućuje ekspresiju iLID proteina na koji je vezana peptidna sekvenca koja uzrokuje njegovo vezanje na membranu mitohondrija. Uz to, iLID protein je obilježen žutim fluorescentnim proteinom Venus.

U svim provedenim eksperimentima najprije je vizualizirana lokalizacija proteina prije aktivacije iLID sustava, tj. prije uključivanja plavog svjetla. Prije aktivacije plavim svjetlom, protein TACC3 lokaliziran je na diobenom vretenu, primarno na dijelovima gdje se očekuje postojanje paralelnih svežnjeva mikrotubula (slika 13). Valja primijetiti da svjetlo valne duljine 561 nm, korišteno za pobuđivanje fluorescencije tgRFPt proteina, nije uzrokovalo aktivaciju iLID sustava i translokaciju na mitohondrije (slika 13). Ovaj rezultat pokazuje da je odgovor sustava specifičan na svjetlo nižih valnih duljina te da je moguće koristiti crveni fluorescentni protein za vizualizaciju lokalizacije proteina bez da se aktivira iLID sustav.



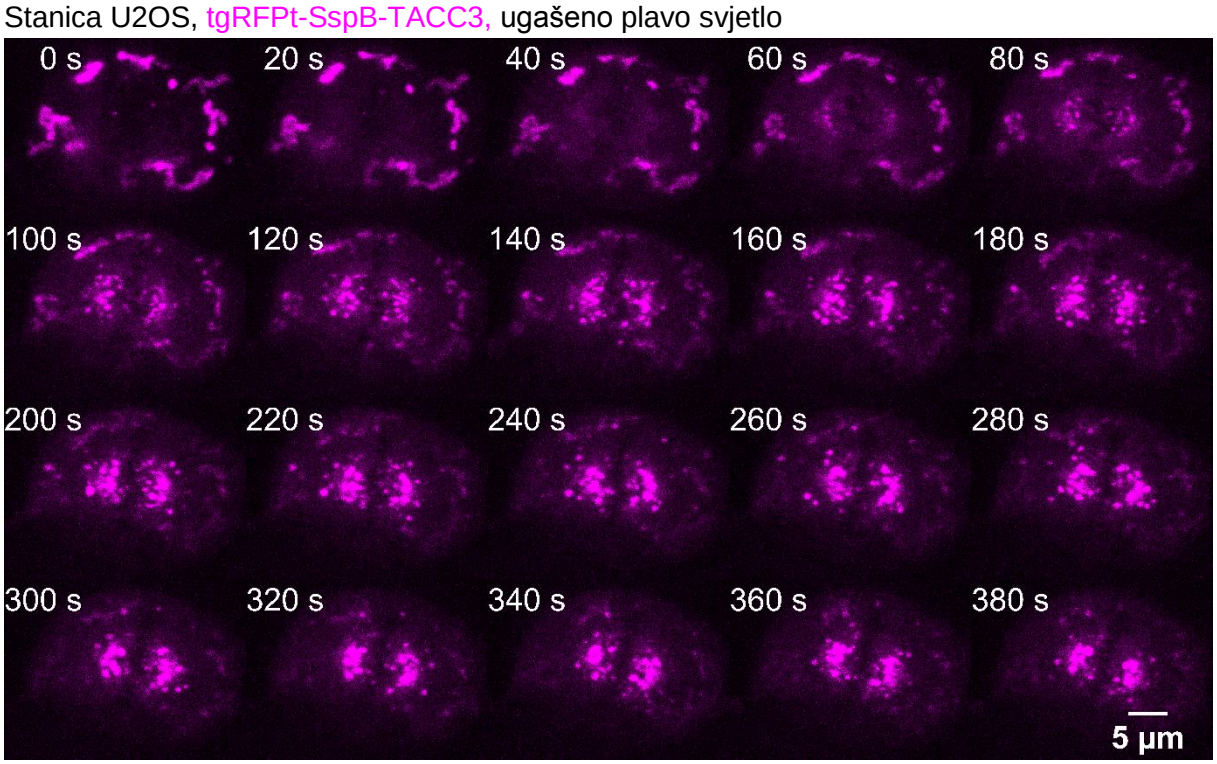
Slika 13. Lokalizacija proteina TACC3 u diobenom vretenu. Protein je lokaliziran na dijelu gdje postoje paralelni svežnjevi mikrotubula, dok ga nema u središnjem dijelu gdje se nalaze antiparalelni mikrotubuli. Na slikama je označeno vrijeme prije uključivanja plavog svjetla. Snimanje korištenjem lasera valne duljina 561 nm ne uzrokuje translokaciju proteina na mitohondrije.

Paljenjem plavog svjetla valne duljine 488 nm aktivira se iLID sustav te se pobuđuje fluorescencija žutog fluorescentnog proteina Venus kojim su označeni mitohondriji (slika 14, gore). Kako je vidljivo iz slike 14, aktivacija iLID sustava uzrokuje brzu translokaciju proteina TACC3 s diobenog vretena na mitohondrije. Translokacija započinje odmah nakon aktivacije, a već nakon 2 minute protein je gotovo u potpunosti uklonjen iz diobenog vretena.



Slika 14. Uklanjanje proteina TACC3 iz diobenog vretena korištenjem plavog svjetla. Venus i tgRFPt kanal (gore). Samo tgRFPt kanal (dolje). Plavo svjetlo upaljeno je u vremenu t=0 s.

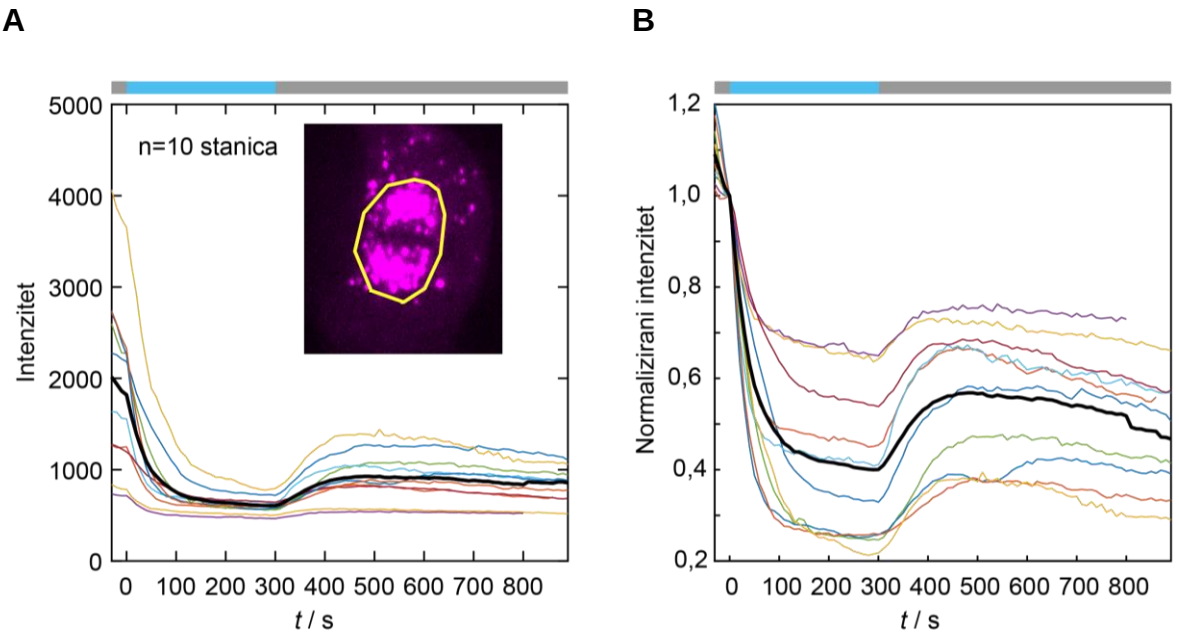
Gašenjem plavog svjetla afinitet iLID sustava za dimerizaciju se smanjuje te dolazi do disocijacije proteina TACC3 s mitohondrija te njegovog povratka na diobeno vreteno (slika 15). Vidljivi povratak proteina na diobeno vreteno započinje oko 40 sekundi nakon gašenja plavog svjetla, a za potpuni povratak potrebno je oko 5 minuta.



Slika 15. **Povratak proteina TACC3 na diobeno vreteno nakon gašenja plavog svjetla.** Plavo svjetlo ugašeno je u vremenu *t*=0 s.

4.2.2. Kinetika reverzibilnog uklanjanja proteina TACC3

Kako bi se odredila kinetika reverzibilnog uklanjanja proteina TACC3 provedeno je mjerenje intenziteta tgRFPt signala na diobenom vretenu u 10 stanica (slika 16A). Očekivano, za vrijeme kad je plavo svjetlo upaljeno dolazi do smanjivanja intenziteta signala na diobenom vretenu, dok se nakon gašenja plavog svjetla intenzitet ponovno pojačava uslijed povratka proteina na vreteno. Nakon povratka proteina na diobeno vreteno signal se ne vraća na početnu vrijednost jer je tijekom snimanja došlo do gubitka intenziteta crvenog fluorescentnog proteina (tzv. fotoizbljeđivanje, engl. *photobleaching*).[60] Kako je vidljivo iz slike 16A, početni intenzitet signala jako varira između pojedinačnih stanica. Zbog toga je potrebno normalizirati podatke kako bilo moguće odrediti kinetičke parametre (slika 16B).



Slika 16. Intenzitet tgRFPt signala na diobenom vretenu. (A) Originalni podatci. **(B)** Podatci normalizirani s obzirom na intenzitet u t=0 s**.** Na slici u lijevom grafu prikazan je način mjerenja signala. Boja linije iznad grafa označava vrijeme kad je plavo svjetlo upaljeno (plavo), odnosno ugašeno (crno). Tanke linije u boji odgovaraju pojedinačnim stanicama, a debela crna linija prosječnoj vrijednosti.

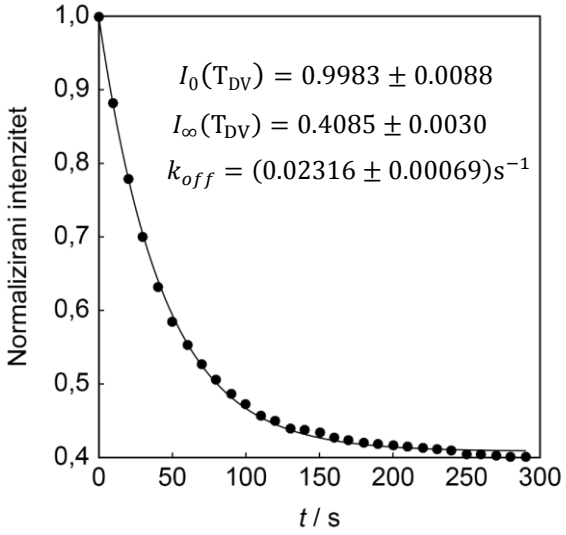
Za očekivati je da će brzina uklanjanja proteina iz diobenog vretena ovisiti o brzini kojom protein disocira s diobenog vretena, tj. o brzini kojom se odvija proces:

$$\mathrm{T_{DV}} \xrightarrow{k_{off}} \mathrm{T_C}$$

Gdje $\mathrm{T_{DV}}$ označava protein TACC3 vezan na diobeno vreteno, a $\mathrm{T_C}$ protein koji je slobodan u citoplazmi. Budući da je intenzitet fluorescencije proporcionalan koncentraciji proteina, smanjenje intenziteta signala na diobenom vretenu u vremenu trebalo bi pratiti kinetiku prvog reda prema jednadžbi:[61]

$$I(\mathrm{T_{DV}}) = \left(I_0(\mathrm{T_{DV}}) - I_\infty(\mathrm{T_{DV}})\right) \cdot e^{-k_{off} \cdot t} + I_\infty(\mathrm{T_{DV}}) \quad (1)$$

Gdje je $I_0(\mathrm{T_{DV}})$ intenzitet u t = 0 s, a $I_\infty(\mathrm{T_{DV}})$ konačni intenzitet, koji u slučaju kad je protein u potpunosti uklonjen s diobenog vretena odgovara pozadinskom intenzitetu prisutnom zbog autofluorescencije stanice. Kako je vidljivo iz slike 17, ovaj model dobro opisuje eksperimentalno dobivene rezultate. Vrijednosti parametara određenih nelinearnom regresijom dani su u slici 17A.



Slika 17. Kinetika uklanjanja proteina TACC3 s diobenog vretena. Uklanjanje proteina prati kinetiku prvog reda i može se opisati jednadžbom 1. Točke na grafu odgovaraju normaliziranim eksperimentalno izmjerenim vrijednostima, a puna linija dobivena je nelinearnom regresijom prema jednadžbama 1, odnosno 3. Vrijednosti parametara dane su kao (srednja vrijednost ± interval pouzdanosti od 95%).

Iz određene konstante brzine za proces uklanjanja proteina s diobenog vretena može se odrediti vrijeme polureakcije koje iznosi $t_{1/2}$ = (29,9±0,9) s. To znači da je brzina kojom je moguće ukloniti protein ovom metodom značajno veća u odnosu na prethodno opisanu kemijski induciranu translokaciju proteina TACC3 na mitohondrije u kojoj je vrijeme polureakcije iznosilo oko 4 minute.[24] Osim toga, velika prednost ove metode je njezina reverzibilnost, što omogućuje bolju kontrolu nad eksperimentima te lakšu interpretaciju opaženog fenotipa.

Valja napomenuti da se protein TACC3 u diobenom vretenu nalazi u kompleksu s proteinima ch-TOG i klatrinom.[23] Tijekom kemijski inducirane translokacije na mitohondrije, ova tri proteina ostaju u kompleksu, pa se uklanjanjem TACC3 uklanjaju i ch-TOG i klatrin.[24] Za pretpostaviti je da se i prilikom primjene ovdje opisane metode događa isto. Međutim, za potvrdu ove pretpostavke bilo bi potrebno odrediti lokalizaciju proteina ch-TOG i klatrina nakon izlaganja stanica plavom svjetlu. To je moguće napraviti korištenjem imunokemijskih metoda na način da se stanice nakon izlaganja plavom svjetlu fiksiraju te se pomoću antitijela specifičnih za navedene proteine odredi njihova lokalizacija.

Budući da je fenotip nakon uklanjanja TACC3 iz diobenog vretena translokacijom na mitohondrije već prethodno detaljno opisan,[24] u ovom radu nije ispitivan fenotip, već je cilj bio usporediti kinetičke parametre dviju metoda. Međutim, bilo bi zanimljivo okarakterizirati fenotip stanica nakon povratka proteina na diobeno vreteno, što nije bilo moguće prilikom korištenja kemijski inducirane dimerizacije budući da ta metoda nije reverzibilna.

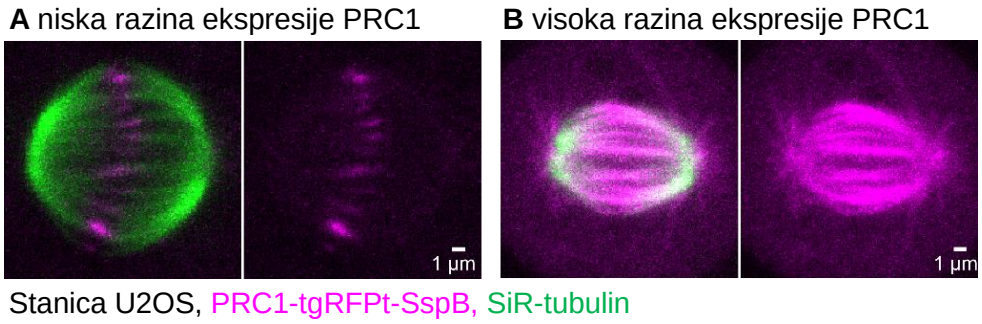
4.3. Uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena

4.3.1. Razina ekspresije proteina PRC1 u stanici utječe na proces translokacije proteina

Nakon što je ispitana učinkovitost razvijene metode za uklanjanje proteina TACC3 iz diobenog vretena, idući cilj bio je primijeniti ovu metodu za proučavanje uloge proteina PRC1 u metafaznom diobenom vretenu. PRC1 je ne-motorni protein koji se veže na preklapajuće dijelove antiparalelnih mikrotubula.[28, 29] Iako je dobro poznata i karakterizirana uloga ovog proteina u anafazi i citokinezi,[30, 31] njegova uloga u metafazi tek je nedavno djelomično karakterizirana.[18, 20]

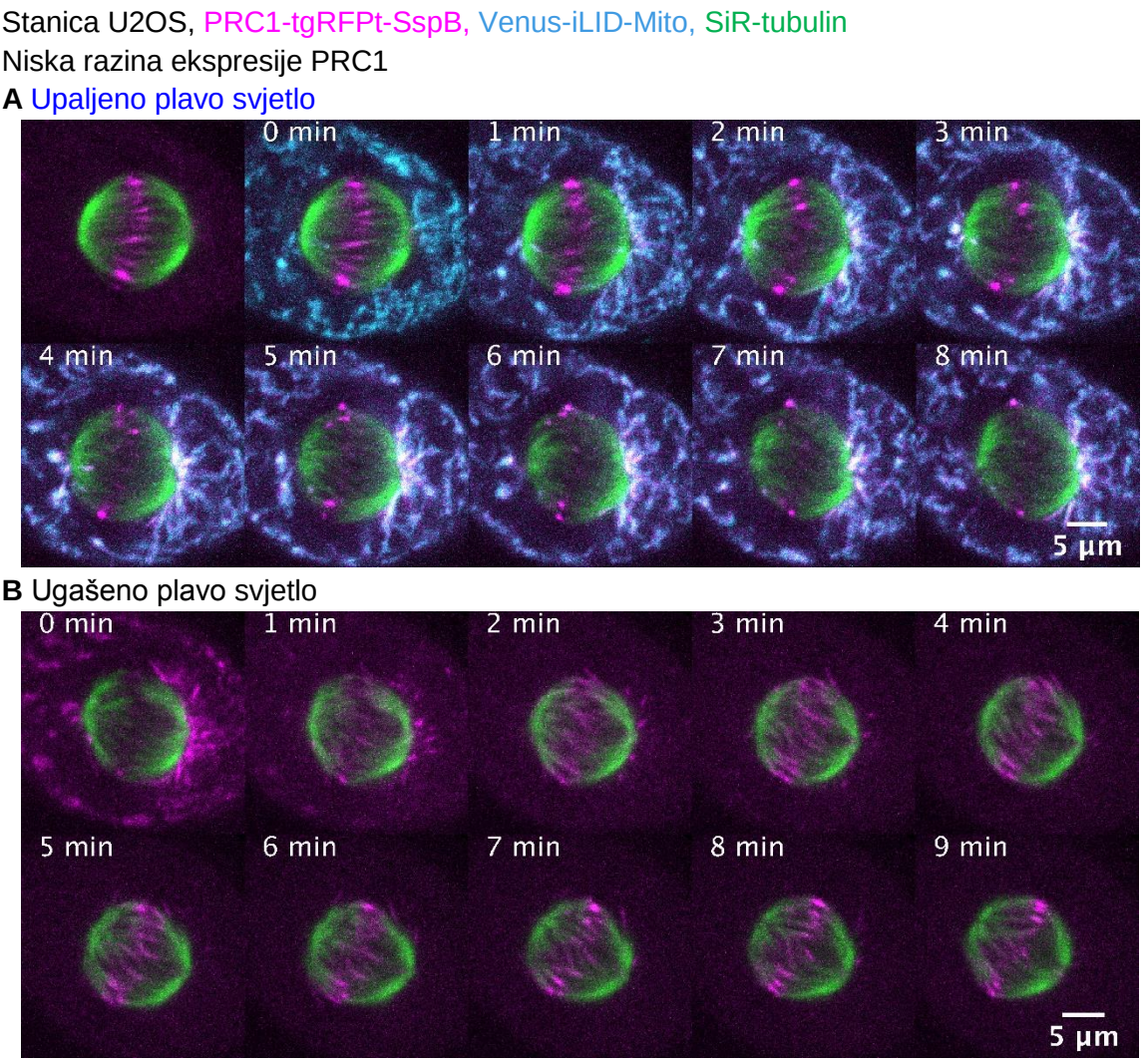
Stanice U2OS transfecirane su plazmidom tgRFPt-SspB-WT-PRC1 koji omogućuje ekspresiju proteina PRC1 obilježenog crvenim fluorescentnim proteinom tgRFPt i proteinom SspB, te Venus-iLID-Mito plazmidom. Uz to, u stanicama je provedeno bojanje tubulina bojom SiR-tubulin kako bi se vizualizirali mikrotubuli.[62] Ovdje će najprije biti opisani eksperimenti u kojima su stanice tretirane kontrolnom (engl. *nontargeting*) siRNA. To znači da je u stanicama uz protein eksprimiran s plazmida prisutan i endogeni protein. U kasnijim poglavljima bit će opisani eksperimenti u kojima je korištenjem RNA interferencije uklonjen endogeni PRC1.

Nakon tranzijentne ekspresije, protein PRC1-tgRFPt-SspB lokaliziran je u središnjem dijelu diobenog vretena, u području gdje se nalaze antiparalelni svežnjevi mikrotubula (slika 18). Međutim, kao posljedica tranzijentne transfekcije stanica javlja se velika razlika u razini ekspresije proteina između pojedinačnih stanica (slika 18).

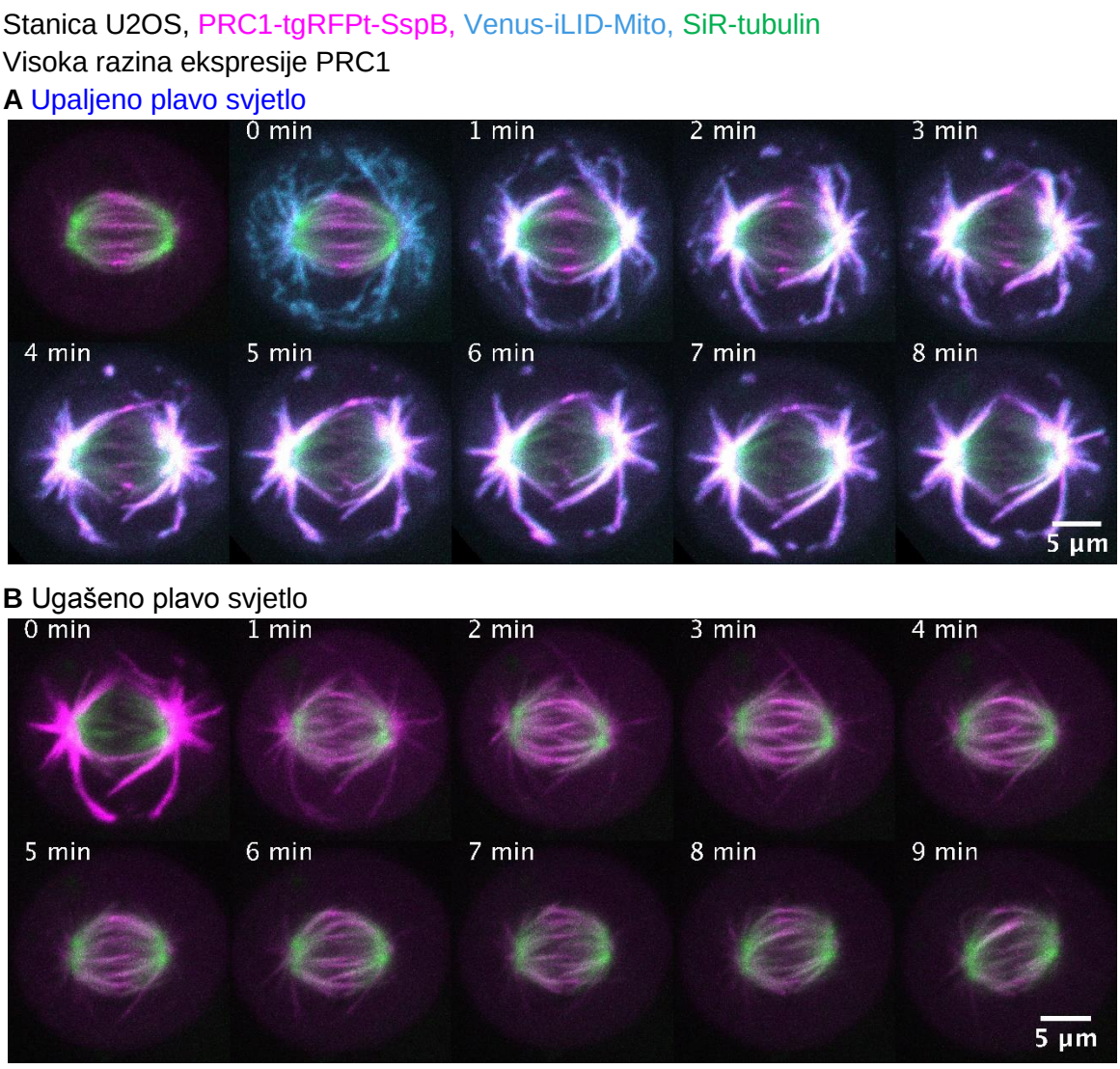


Slika 18. Heterogena ekspresija PRC1 nakon tranzijentne ekspresije. (A) Niska razina ekspresije, **(B)** visoka razina ekspresije. Kontrast je na obje slike jednako podešen kako bi bilo moguće uočiti razliku u količini proteina. Uklanjanje PRC1 iz diobenog vretena u stanicama A i B prikazano je na slikama 19, odnosno 20.

Iako se slična heterogenost u ekspresiji mogla uočiti i kod proteina TACC3, to nije utjecalo na proces translokacije proteina na mitohondrije. Zanimljivo, u slučaju proteina PRC1, razina ekspresije značajno je utjecala na ovaj proces. Kako je vidljivo iz slike 19A, prilikom uklanjanja proteina iz diobenog vretena u stanici koja ima relativno malu količinu proteina (slika 18A), dolazi do djelomičnog agregiranja mitohondrija te blagog nakupljanja mitohondrija i proteina PRC1 na polovima diobenog vretena. S druge strane, u slučaju kad je ekspresija proteina PRC1 relativno visoka (slika 18B), dolazi do značajnog agregiranja mitohondrija te nakupljanja proteina i mitohondrija na polovima i na vanjskim k-vlaknima diobenog vretena (slika 20A). Unatoč tome, u oba slučaja protein je u nekoliko minuta uspješno uklonjen iz središnjeg dijela diobenog vretena (slike 19A, 20A, 21A i 21B), a vrijeme polureakcije za taj proces iznosi $t_{1/2}$ = (76,3±10,6) s. Nakon gašenja plavog svjetla PRC1 disocira s mitohondrija te se vraća na diobeno vreteno (slike 19B, 20B, 21D i 21D).

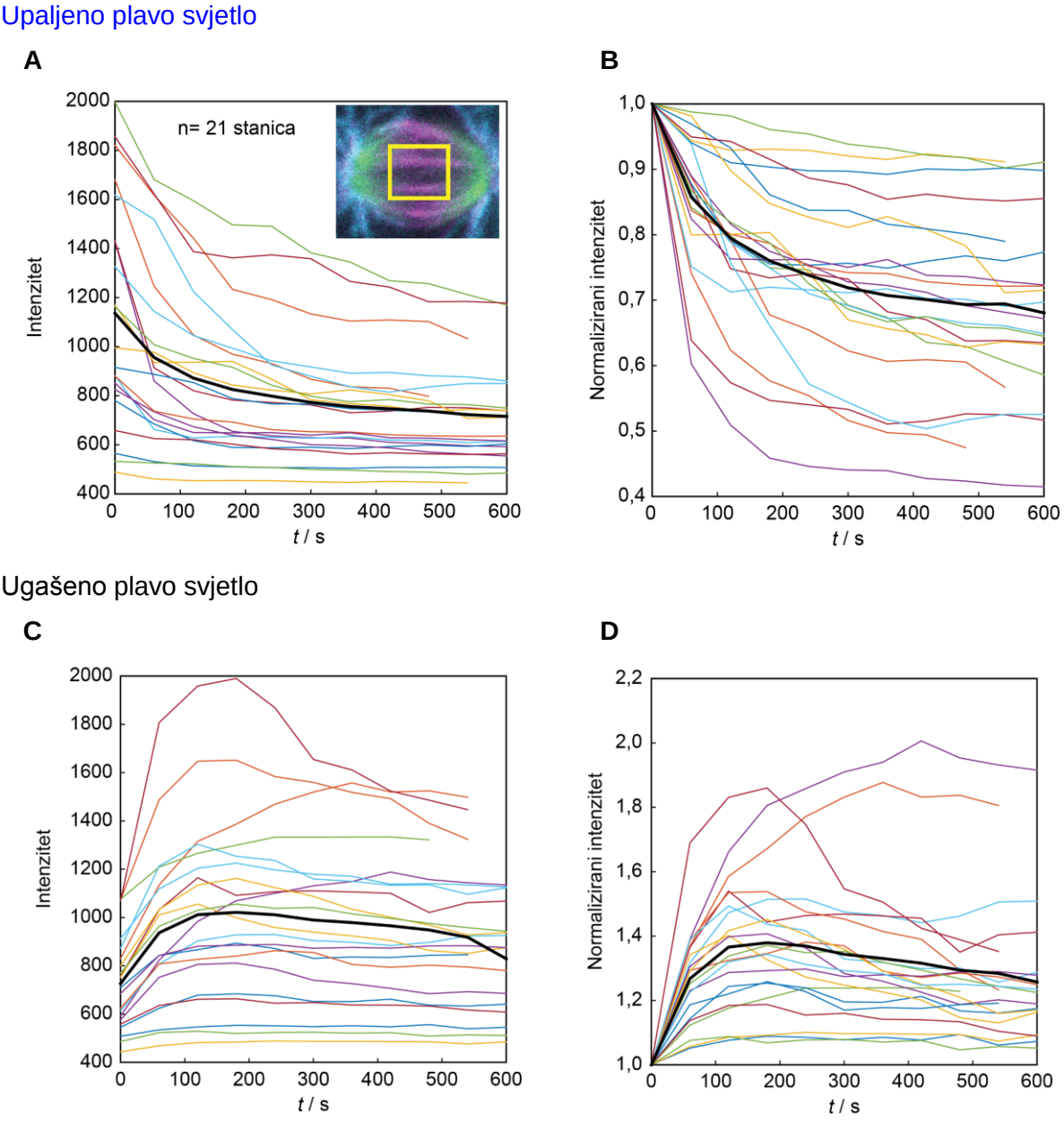


Slika 19. Reverzibilno uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena u stanici s niskom razinom ekspresije proteina. (A) Pod utjecajem plavog svjetla PRC1 odlazi s diobenog vretena na mitohondrije uslijed čega se može primijetiti stvaranje agregata mitohondrija te nakupljanje dimeriziranih mitohondrija i proteina PRC1 na desnom polu diobenog vretena. Plavo svjetlo upaljeno je u *t*=0 min. Stanica prije aktivacije snimljena je oko 10 s prije paljenja plavog svjetla. **(B)** Nakon gašenja plavog svjetla PRC1 se vraća u središnji dio diobenog vretena.



Slika 20. Reverzibilno uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena u stanici s visokom razinom ekspresije proteina. (A) Tijekom translokacije proteina PRC1 na mitohondrije pod utjecajem plavog svjetla vrlo brzo se stvaraju agregati mitohondrija te se PRC1 i mitohondriji nakupljaju na polovima diobenog vretena i na vanjskim k-vlaknima. Plavo svjetlo upaljeno je

u *t*=0 min. Stanica prije aktivacije snimljena je oko 10 s prije paljenja plavog svjetla. **(B)** Nakon gašenja plavog svjetla PRC1 se vraća u središnji dio diobenog vretena.



Slika 21. Intenzitet tgRFPt signala u središnjem dijelu diobenog vretena nakon paljenja (A) i (B) i gašenja (C) i (D) plavog svjetla. Prikazani su originalni (A) i (C) te normalizirani (B) i (D) intenziteti. Podatci normalizirani s obzirom na intenzitet u *t*=0 s**.** Na slici u prvom grafu prikazan je način mjerenja signala. Tanke linije u boji odgovaraju pojedinačnim stanicama, a debela crna linija prosječnoj vrijednosti.

Činjenica da se protein PRC1 nakon aktivacije nakuplja na polovima neobična je budući da se na ovom dijelu diobenog vretena nalaze paralelni astralni mikrotubuli. Moguće objašnjenje ovakvog rezultata je da vezanje proteina PRC1 na pojedinačne mikrotubule koji rastu iz polova inducira nastajanje antiparalelnih svežnjeva. Sposobnost proteina PRC1 da inducira nastajanje antiparalelnih svežnjeva već je predložena na temelju strukturne analize proteina.[29] S druge strane, moguće je da je uslijed translokacije na mitohondrije došlo do promjene konformacije proteina PRC1 koja je uzrokovala povećani afinitet za vezanje paralelnih mikrotubula. Naime, veći afinitet ovog proteina za antiparalelne mikrotubule objašnjava se rigidnom strukturom dimerizacijske domene koja spaja dva monomera proteina PRC1 u homodimer.[29] Moguće promjene u konformaciji ove domene možda su uzrokovale i promjenu u afinitetu proteina za mikrotubule.

Osim što je nakon aktivacije došlo do nakupljanja proteina na polovima diobenog vretena, moglo se primijetiti i da je došlo do povećanja intenziteta fluorescencije PRC1-tgRFPt u cijeloj stanici. Ova pojava bila je osobita izražena u slučaju visoke početne ekspresije proteina. Tako je u stanici prikazanoj na slici 20, prosječni intenzitet signala u slici dobivenoj zbrajanjem 5 snimljenih ravnina iznosio 3832 prije aktivacije, dok je osam minuta nakon aktivacije iznosio 6093. Nakon gašenja plavog svjetla došlo je do ponovnog smanjenja intenziteta u cijeloj stanici. Intenzitet je s 5501 u nula minuta pao na 4685 već nakon jedne minute te na 3476 nakon osam minuta Ovakav rezultat ne može se objasniti akumuliranjem citoplazmatskog proteina iz ravnina koje nisu zahvaćene snimanjem, budući da je intenzitet signala u citoplazmi određen na istom mjestu u stanici iznosio 3004 prije aktivacije, a 3045 osam minuta nakon aktivacije. Slično, premda znatno manje izraženo povećanje signala dogodilo se u stanici prikazanoj na slici 19, gdje je intenzitet signala s početnih 2184 narastao na 2366 osam minuta nakon aktivacije. Nakon gašenja plavog svijetla signal je pao s početnih 2345 na 2153 nakon osam minuta.

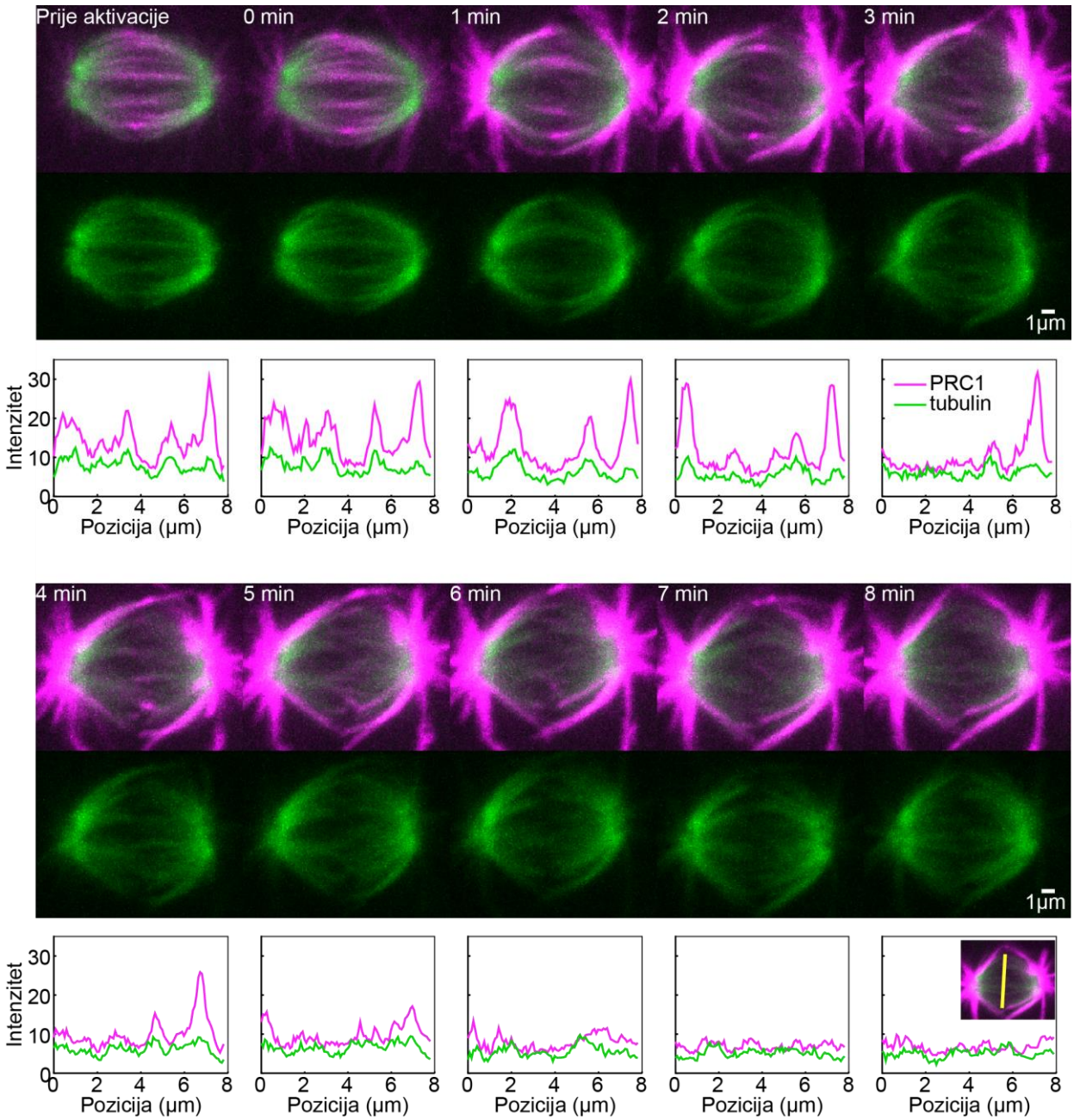
Valja napomenuti i da se protein PRC1 u diobenom vretenu nalazi u interakciji s kinezinom-4.[63, 64] Za sada nije poznato ostaju li ova dva proteina u interakciji uslijed translokacije na mitohondrije. Kako bi se odredilo uzrokuje li uklanjanje proteina PRC1 istovremeno uklanjanje kinezina-4 iz diobenog vretena, trebalo bi napraviti imunokemijsko bojanje stanica kojim bi se odredila lokalizacija kinezina-4 nakon izlaganja stanica plavom svjetlu.

4.3.2. Uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena uzrokuje raspadanje svežnjeva mikrotubula

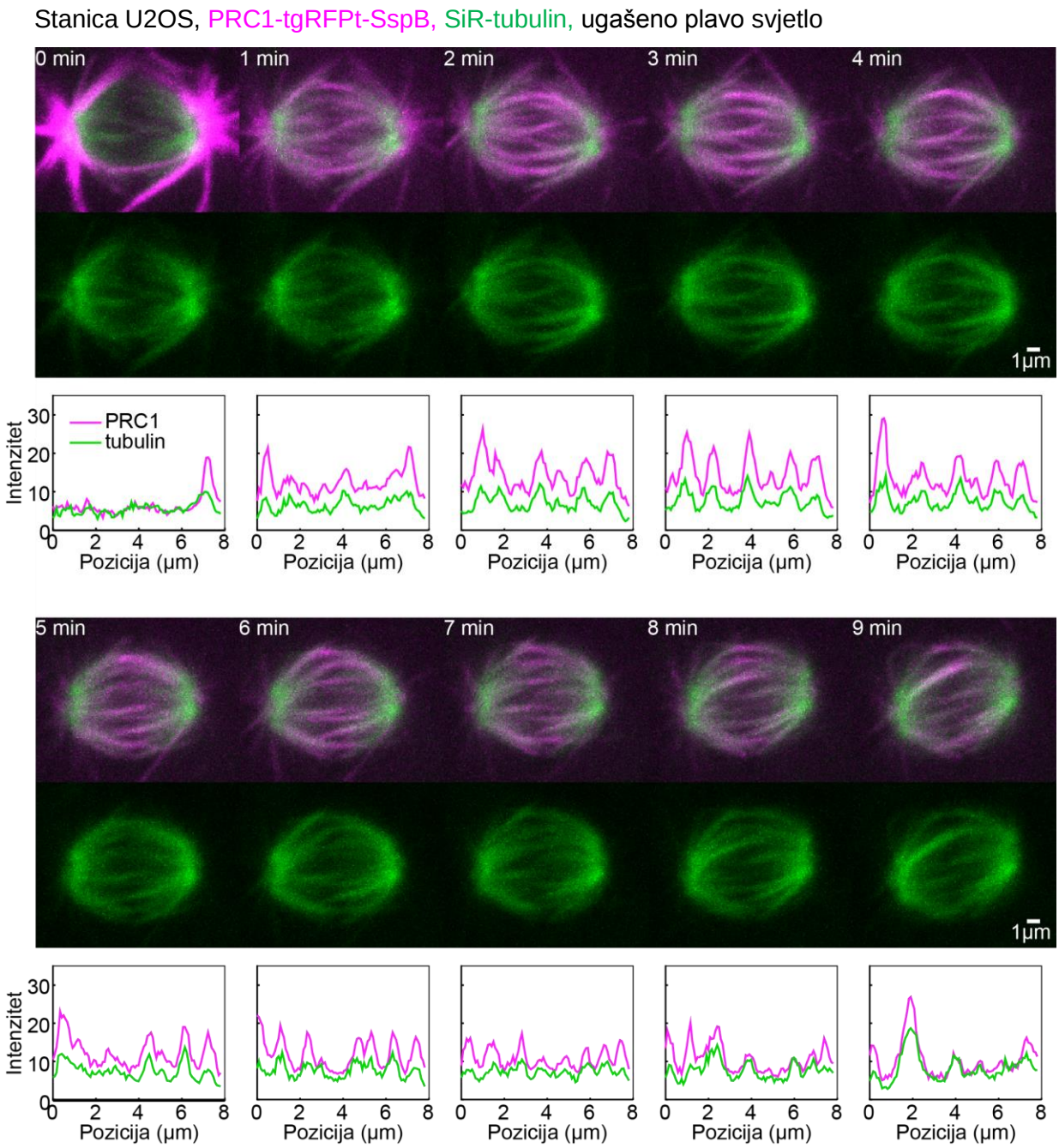
Nakon što je pokazano da ova metoda omogućuje uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena, sljedeći cilj bio je odrediti dolazi li do promjene fenotipa diobenog vretena kako se mijenja količina proteina. Prilikom uklanjanja proteina s diobenog vretena može se primijetiti smanjenje intenziteta signala tubulina u središtu diobenog vretena, što je osobito izraženo u slučaju visoke ekspresije proteina PRC1 (slika 22). Kako bi se kvantificirala ova pojava provedena je analiza profila intenziteta fluorescencije SiR-tubulina i PRC1-tgRFPt u središtu diobenog vretena. Na grafičkim prikazima na slici 22 jasno je vidljivo da prije aktivacije postoje maksimumi intenziteta na približno istim položajima u oba kanala, koji odgovaraju antiparalelnim svežnjevima mikrotubula u središtu vretena. Uslijed uklanjanja proteina PRC1 iz diobenog vretena očekivano je vidljiv pad intenziteta fluorescencije PRC1-tgRFPt. Zanimljivo, istovremeno s gubitkom signala PRC1-tgRFPt, smanjuje se i intenzitet signala SiR-tubulina, a nakon potpunog uklanjanja proteina PRC1 iz vretena više nisu vidljivi niti maksimumi u SiR-tubulin kanalu.

Gašenjem plavog svjetla PRC1 se vraća na diobeno vreteno, prilikom čega dolazi i do porasta intenziteta fluorescencije SiR-tubulina u središtu vretena (slika 23). Iz analize profila intenziteta jasno je vidljivo da položaji novonastalih svežnjeva mikrotubula odgovaraju položaju PRC1-tgRFPt signala. Dakle, povratak proteina PRC1 na diobeno vreteno omogućuje ponovno nastajanje antiparalelnih svežnjeva mikrotubula u središnjem dijelu vretena.

Činjenica da je promjenom količine proteina PRC1 moguće inducirati raspadanje i ponovno nastajanje svežnjeva mikrotubula pokazuje da je PRC1 potreban za održavanje antiparalelnih svežnjeva mikrotubula u metafaznom diobenom vretenu.



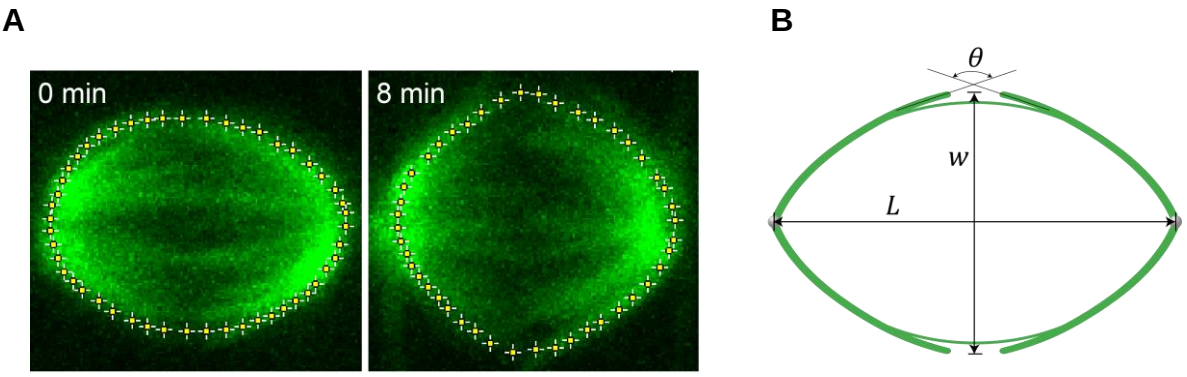
Slika 22. Uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena uzrokuje raspadanje svežnjeva mikrotubula u središnjem dijelu vretena. Nakon paljenja plavog svjetla u *t*=0 min protein PRC1 (ružičasto) uklonjen je iz središta diobenog vretena prilikom čega se gubi i signal SiR-tubulina (zeleno). Slika prije aktivacije snimljena je oko 10 s prije paljenja plavog svjetla. Profili intenziteta fluorescencije određeni su na način prikazan na maloj slici u posljednjem grafu.



Slika 23. Povratkom proteina PRC1 na diobeno vreteno ponovno se formiraju svežnjevi mikrotubula. Nakon gašenja plavog svjetla u vremenu *t*=0 min dolazi do povratka proteina PRC1 (ružičasto) na diobeno vreteno, uslijed čega se povećava i signal fluorescencije SiR-tubulina (zeleno). Profili intenziteta jasno pokazuju maksimume u oba kanala koji odgovaraju pojedinačnim svežnjevima mikrotubula.

4.3.3. Reverzibilno uklanjanje PRC1 uzrokuje promjenu oblika diobenog vretena

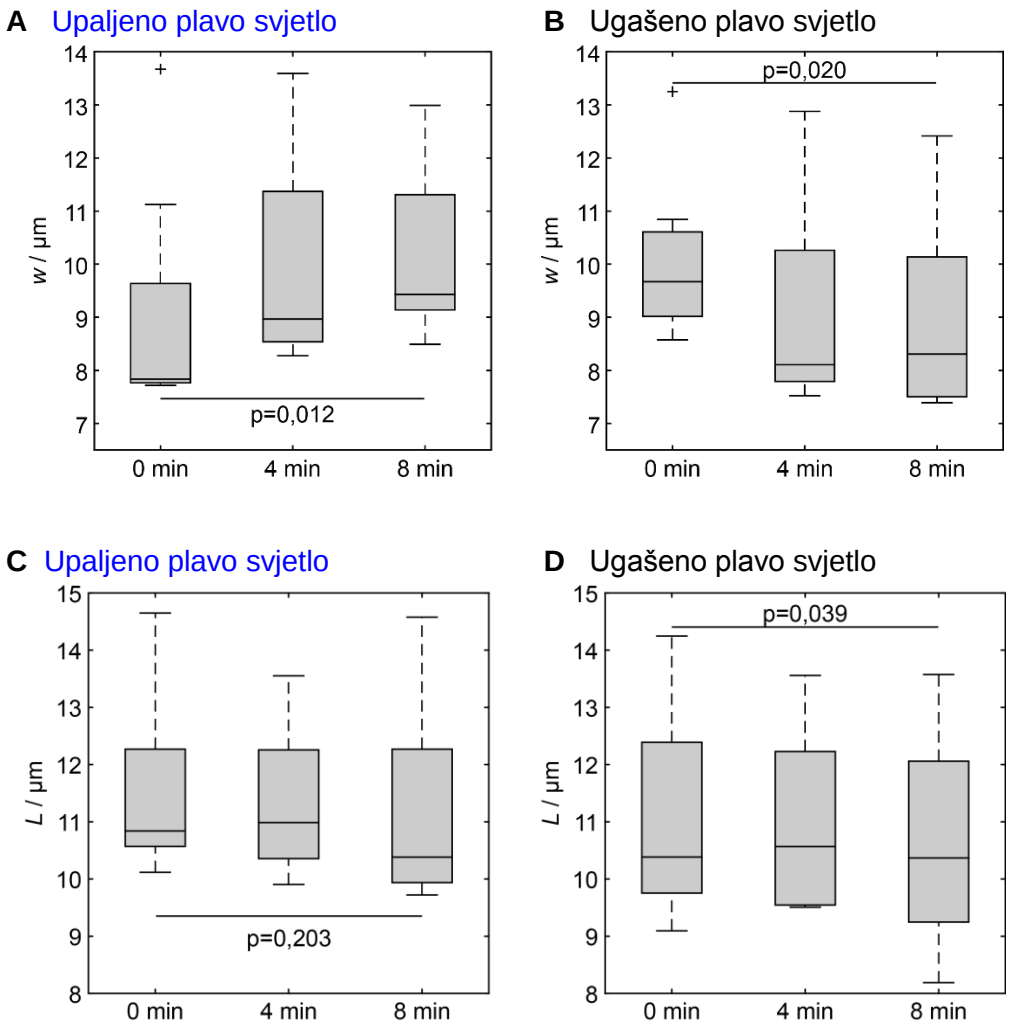
Osim gubitka signala tubulina u središtu diobenog vretena, na slici 22 jasno je vidljivo da uslijed uklanjanja proteina PRC1 iz diobenog vretena dolazi do promijene oblika vretena. Točnije, vidljivo je da dolazi do širenja vretena i izravnavanja vanjskih k-vlakana. S druge strane, tijekom povratka proteina na diobeno vreteno dolazi do ponovnog zaobljivanja vretena pri čemu se njegova širina smanjuje (slika 23). Kako bi se ova pojava kvantificirala napravljena je analiza oblika diobenog vretena na način prikazan na slici 24A te su iz dobivenih podataka određene širina i duljina diobenog vretena te kut Θ između sestrinskih k-vlakana (slika 24B). Ova analiza napravljena je na 9 stanica, na snimkama snimljenima neposredno nakon aktivacije, 4 minute nakon aktivacije i 8 minuta nakon aktivacije te neposredno nakon gašenja plavog svjetla te 4 i 8 minuta nakon gašenja plavog svjetla. Za određivanje signifikantnosti promjene određenog parametra korišten je dvosmjerni Wilcoxonov test za uparene uzorke.



Slika 24. Analiza oblika diobenog vretena. (A) U programu ImageJ određene su koordinate konture diobenog vretena na temelju kojih su izračunati analizirani parametri. **(B)** Prikaz parametara korištenih za karakterizaciju oblika diobenog vretena.

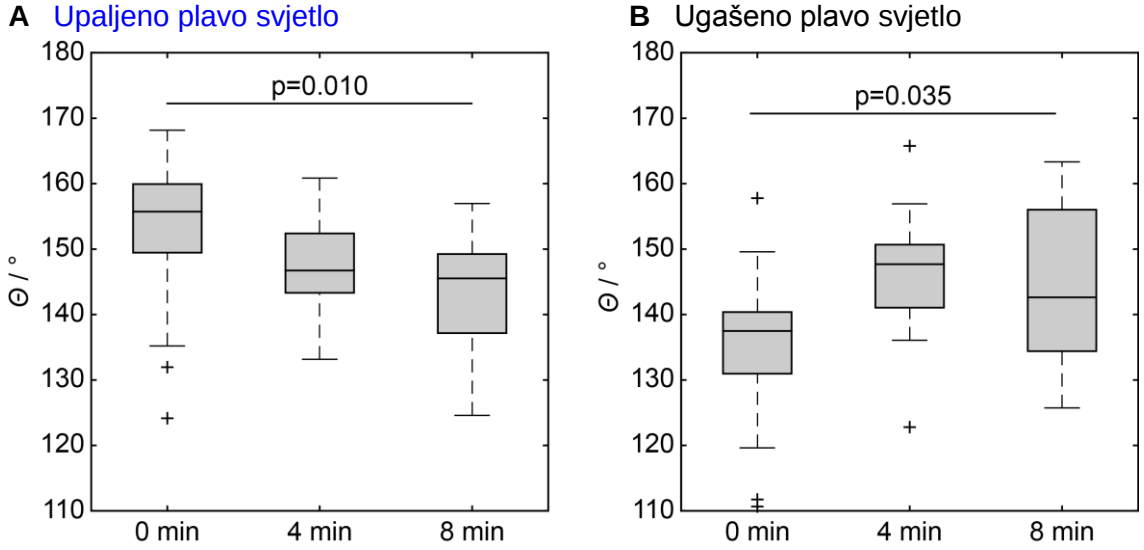
Neposredno nakon aktivacije prosječna širina diobenog vretena iznosila je (9,00±0,69) μm (srednja vrijednost ± standardna pogreška), a nakon 8 minuta povećala se na (10,09±0,50) μm (slika 25A, p=0,012). Nakon gašenja plavog svjetla širina vretena promijenila se s početnih (10,02±0,47) μm na (8,98±0,57) μm nakon 8 minuta (slika 25B, p=0,020). Bitno je primijetiti da se prosječna vrijednost širine 8 minuta nakon gašenja plavog svjetla smanjila na razinu one prije aktivacije (p=0,910). Dakle, kao posljedica povratka proteina PRC1 na diobeno vreteno, širina vretena se vratila na početnu razinu. Duljina vretena iznosila je u prosjeku (11,49±0,50)

μm neposredno nakon paljenja plavog svjetla, a (11,15±0,54) μm 8 minuta nakon toga, što nije predstavljalo statistički značajnu promjenu (p=0,203, slika 25C). Neposredno nakon gašenja plavog svjetla diobeno vreteno u prosjeku je bilo dugačko (11,04±0,58) μm, a nakon 8 minuta (10,70±0,59) μm (slika 25D, p=0,039). Iako u ovom slučaju statistički test pokazuje značajnu promjenu duljine, promjena duljine 8 minuta nakon gašenja plavog svjetla u odnosu na duljinu prije paljenja plavog svjetla nije bila statistički signifikantna (p=0,074). Iz ovih rezultata može se zaključiti da koncentracija proteina PRC1 u diobenom vretenu utječe na njegovu širinu na način da povećana koncentracija proteina smanjuje širinu vretena. S druge strane, promjena koncentracije proteina PRC1 ne mijenja značajno duljinu vretena. Opaženo blago smanjivanje diobenog vretena moglo bi biti posljedica oštećenja stanice zbog snimanja (engl. *photodamage*).[60]



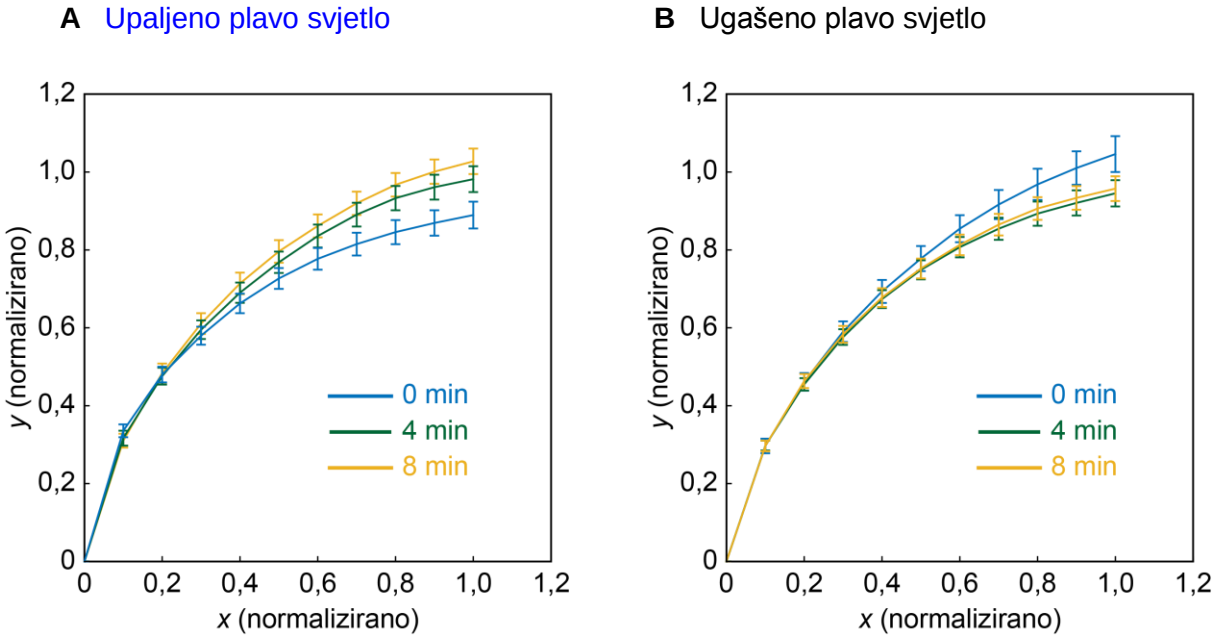
Slika 25. Širina (A i B) i duljina (C i D) diobenog vretena nakon paljenja (A i C) i gašenja (B i D) plavog svjetla. Vrijeme na x-osi označava vrijeme nakon paljenja, odnosno gašenja plavog svjetla, n=9 stanica. U ovim, kao i u svim budućim *box plot* prikazima, crna horizontalna linija označava medijan, sivi pravokutnik označava dio između prvog i trećeg kvartila, a isprekidana linija označava minimalnu, odnosno maksimalnu vrijednost. Znakom plus označeni su *outlieri*, koji su određeni kao podatci veći od $q_3 + 1{,}5 \cdot (q_3 - q_1)$ ili manji od $q_1 - 1{,}5 \cdot (q_3 - q_1)$, gdje su q_1 i q_3 prvi, odnosno treći kvartil. P-vrijednost određena je korištenjem dvosmjernog Wilcoxonovog testa za uparene uzorke.

Analizom kuta Θ između sestrinskih k-vlakana dobiva se informacija o obliku vanjske konture diobenog vretena (slika 24B). Ovaj kut bit će to veći što je zakrivljenost veća, dok će izravnavanjem vanjskih k-vlakana kut postati manji (slika 24A). Analizom provedenom na 9 stanica određeno je da je prosječna veličina ovog kuta neposredno nakon paljenja plavog svjetla iznosila (153,0±2,8)°, dok se nakon 8 minuta smanjila na (142,5±2,2)° (slika 26A, p=0,010). Dakle, uslijed uklanjanja proteina PRC1 iz diobenog vretena dolazi do značajnog izravnavanja vanjskih k-vlakana. Nakon gašenja plavog svjetla došlo je do ponovnog povećanja kuta s početnih (135,3±2,8)°, na (144,3±2,6)° nakon 8 minuta (slika 26B, p=0,035). Ovakav rezultat odgovara ponovnom zaobljivanju vanjske konture diobenog vretena prilikom povratka proteina PRC1 na vreteno što je i vidljivo na primjeru stanice prikazane na slici 23.



Slika 26. Kut između sestrinskih k-vlakana. (A) Uslijed uklanjanja proteina PRC1 s diobenog vretena kut se povećava zbog izravnavanja vanjskih k-vlakana. **(B)** Nakon gašenja plavog svjetla i povratka proteina PRC1 na diobeno vreteno dolazi do ponovnog smanjenja kuta, tj. ponovnog zaobljivanja diobenog vretena. N=18 kutova u 9 stanica.

Kao informativan i sažet prikaz promjene oblika diobenog vretena može poslužit normalizirana kontura vanjskog k-vlakna (slika 27).[18] Iz ovakvog prikaza jasno je vidljivo da tijekom uklanjanja proteina PRC1 iz diobenog vretena dolazi do izravnavanja k-vlakna, uz istovremeno povećanje visine k-vlakna, što odgovara širenju vretena (slika 27A). Nakon gašenja plavog svjetla događaju se suprotni proces, tj. kut pod kojim se nalazi vrh k-vlakna se povećava, a visina se smanjuje (slika 27B).



Slika 27. Normalizirani oblik vanjskog k-vlakna diobenog vretena. Normalizacija je provedena na način da se pol diobenog vretena nalazi na poziciji x=0, a vrh k-vlakna na x = 1. N=36 k-vlakana u 9 stanica.

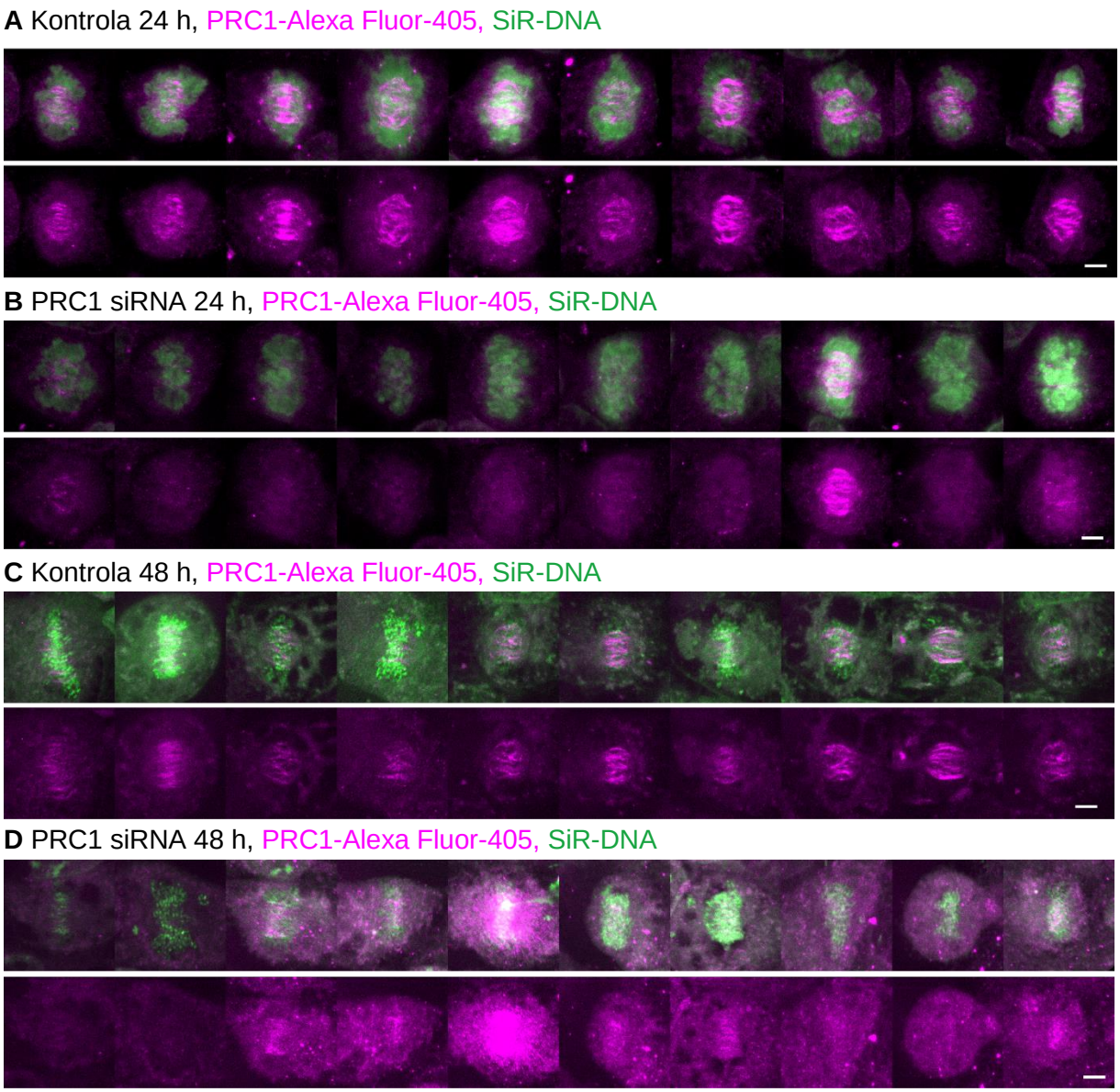
Opaženo izravnavanje vanjske konture diobenog vretena uslijed uklanjanja proteina PRC1 može se objasniti prethodno predloženim modelom diobenog vretena prema kojem premošćujući mikrotubuli omogućuju zakrivljenost vretena (slika 8).[18, 37] Prema ovoj interpretaciji, uslijed gubitka proteina PRC1 dolazi i do raspadanja premošćujućeg vlakna mikrotubula, što je vidljivo kao smanjenje intenziteta signala tubulina u središtu vretena.

Zbog nestanka premošćujućeg vlakna dolazi do izravnavanja sestrinskih k-vlakana. S druge strane, povratkom proteina PRC1 dolazi do ponovnog formiranja premošćujućeg vlakna i zaobljivanja vretena (slika 8A).

4.3.4. RNA interferencijom smanjena je količina endogenog proteina PRC1 u metafazi

U do sada opisanim eksperimentima u stanicama je uz protein PRC1 eksprimiran s plazmida bio prisutan i endogeni, neobilježeni PRC1. To znači da je u tim eksperimentima nakon uklanjanja proteina eksprimiranog s plazmida na diobenom vretenu ostala određena količina endogenog PRC1. Kako bi se ispitao fenotip nakon potpunog uklanjanja proteina PRC1 iz diobenog vretena, stanice su tretirane sa siRNA kojom je smanjena količina endogenog PRC1 u stanici. U tu svrhu korištena je siRNA koja prepoznaje netranslatiranu regiju na odgovarajućoj mRNA. Budući da se na plazmidu nalazi samo kodirajući slijed proteina, ova siRNA neće prepoznavati mRNA koja nastaje prepisivanjem s plazmida, već samo endogeno prisutnu mRNA.

Kako bi se ispitala učinkovitost ove metode za smanjenje količine proteina, na stanicama tretiranima sa siRNA napravljeno je imunokemijsko bojanje kojim je vizualiziran endogeno prisutan PRC1 (slika 28). Metafazna diobena vretena identificirana su na osnovi položaja kromosoma koji su obojani bojom SiR-DNA.[65] U stanicama tretiranima s kontrolnom (engl. *nontargeting*) siRNA protein je lokaliziran u središtu diobenog vretena (slike 28A i C), što je u skladu s literaturnim podatcima.[20, 30] S druge strane, nakon tretmana sa siRNA za PRC1 u većini stanica protein se ne može detektirati ili je količina značajno smanjena (slike 28B i D). Međutim, valja primijetiti da je u određenom broju stanica protein još uvijek prisutan u značajnoj količini. Ova pojava otežava interpretaciju predstojećih eksperimenata budući da tijekom snimanja živih stanica nije moguće odrediti količinu endogenog proteina.

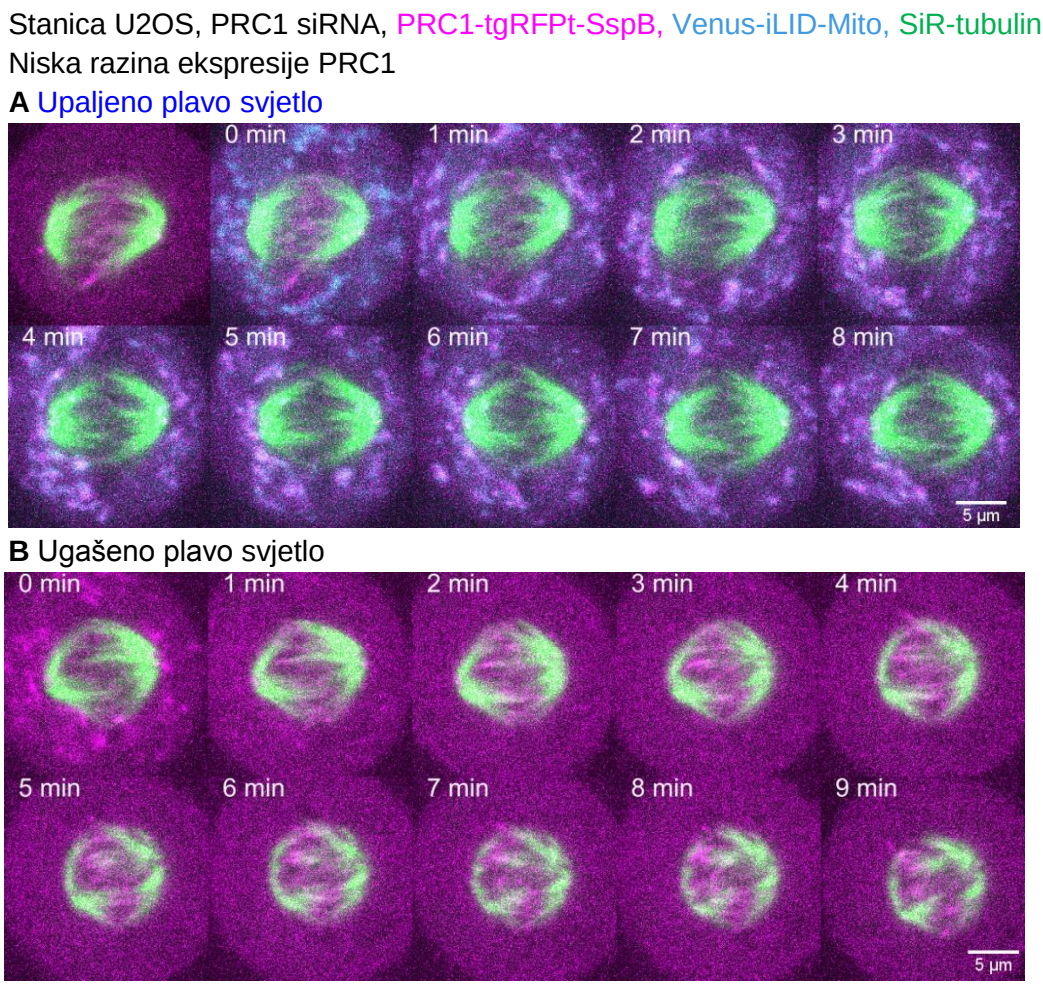


Slika 28. RNA interferencijom smanjena je količina endogeno prisutnog proteina PRC1 u metafaznom diobenom vretenu. U stanicama tretiranima kontrolnom siRNA PRC1 je lokaliziran u središtu diobenog vretena. Nakon tretmana sa siRNA za PRC1 količina proteina je smanjena. Sve stanice snimane su s istim postavkama, a kontrasti u PRC1-Alexa Fluor-405 kanalu podešeni su na jednak način. Stanice su nakon transfekcije sa siRNA inkubirane 24 h ili 48 h, skala označava 5 μm.

4.3.5. Reverzibilno uklanjanje proteina PRC1 nakon RNA interferencije

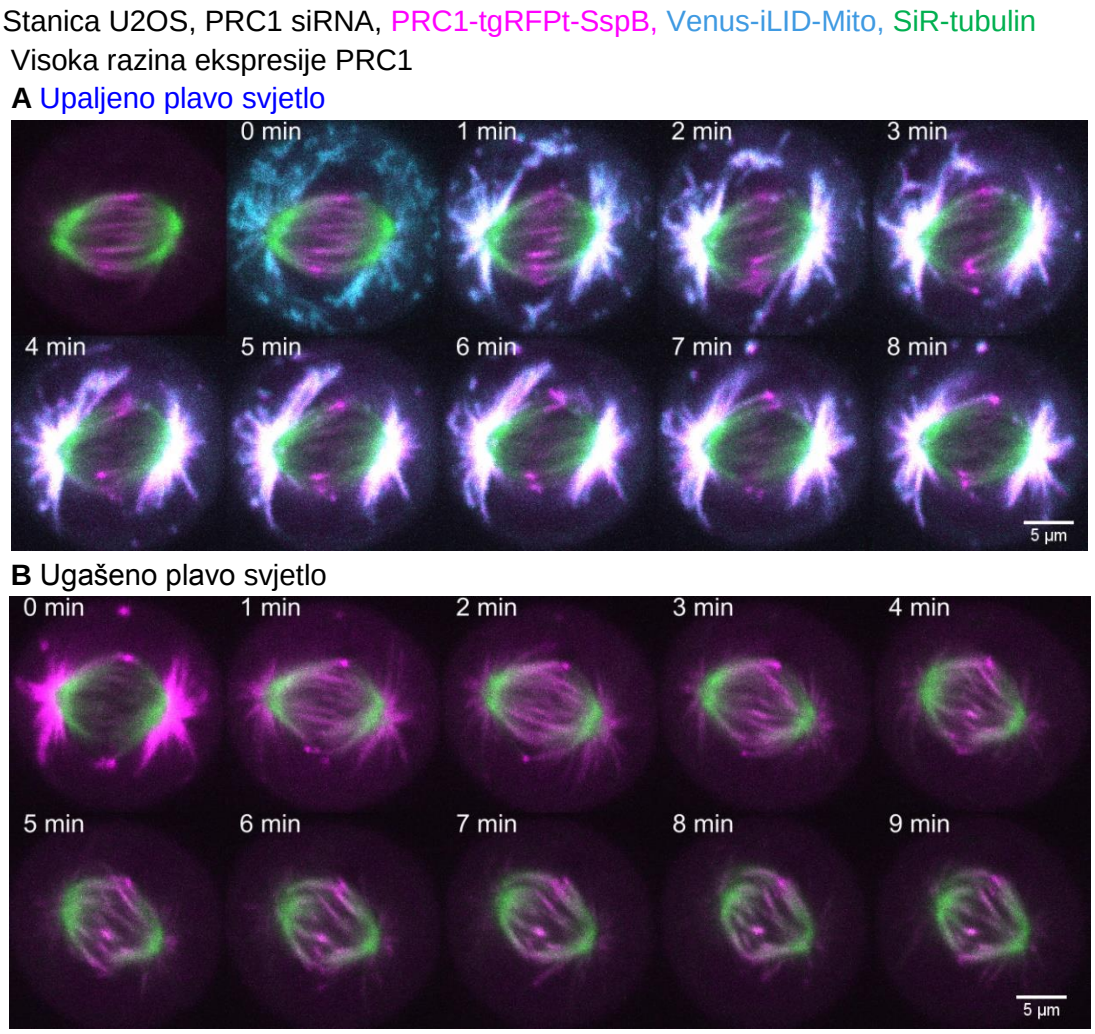
Kako bi se ispitao utjecaj uklanjanja proteina PRC1 iz diobenog vretena u slučaju kad je količina endogenog proteina značajno smanjena, stanice U2OS transfecirane su sa siRNA kojom je smanjena količina endogenog proteina te plazmidima tgRFPt-SspB-WT-PRC1 i Venus-iLID-Mito. Uz to, provedeno je bojanje tubulina bojom SiR-tubulin.

Slično kao i u eksperimentima u kojima je endogeni PRC1 bio prisutan, i u ovom slučaju ekspresija PRC1 u stanicama bila je izrazito heterogena, što je utjecalo na proces translokacije proteina PRC1 na mitohondrije. U slučaju niske ekspresije agregiranje je bilo malo ili ga uopće nije bilo (slika 29A), dok je kod visoke ekspresije dolazilo do stvaranja agregata mitohondrija i nakupljanja na polovima diobenog vretena (slika 30A). U oba slučaja, nakon gašenja plavog svjetla uslijedilo je vraćanje proteina u središnji dio diobenog vretena (slike 29B i 30B).



Slika 29. Reverzibilno uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena u stanici s niskom ekspresijom proteina nakon RNA interferencije. (A) Pod utjecajem plavog svjetla PRC1

odlazi s diobenog vretena na mitohondrije. Plavo svjetlo upaljeno je u *t*=0 min. Stanica prije aktivacije snimljena je oko 10 s prije paljenja plavog svjetla. **(B)** Nakon gašenja plavog svjetla PRC1 se vraća u središnji dio diobenog vretena.

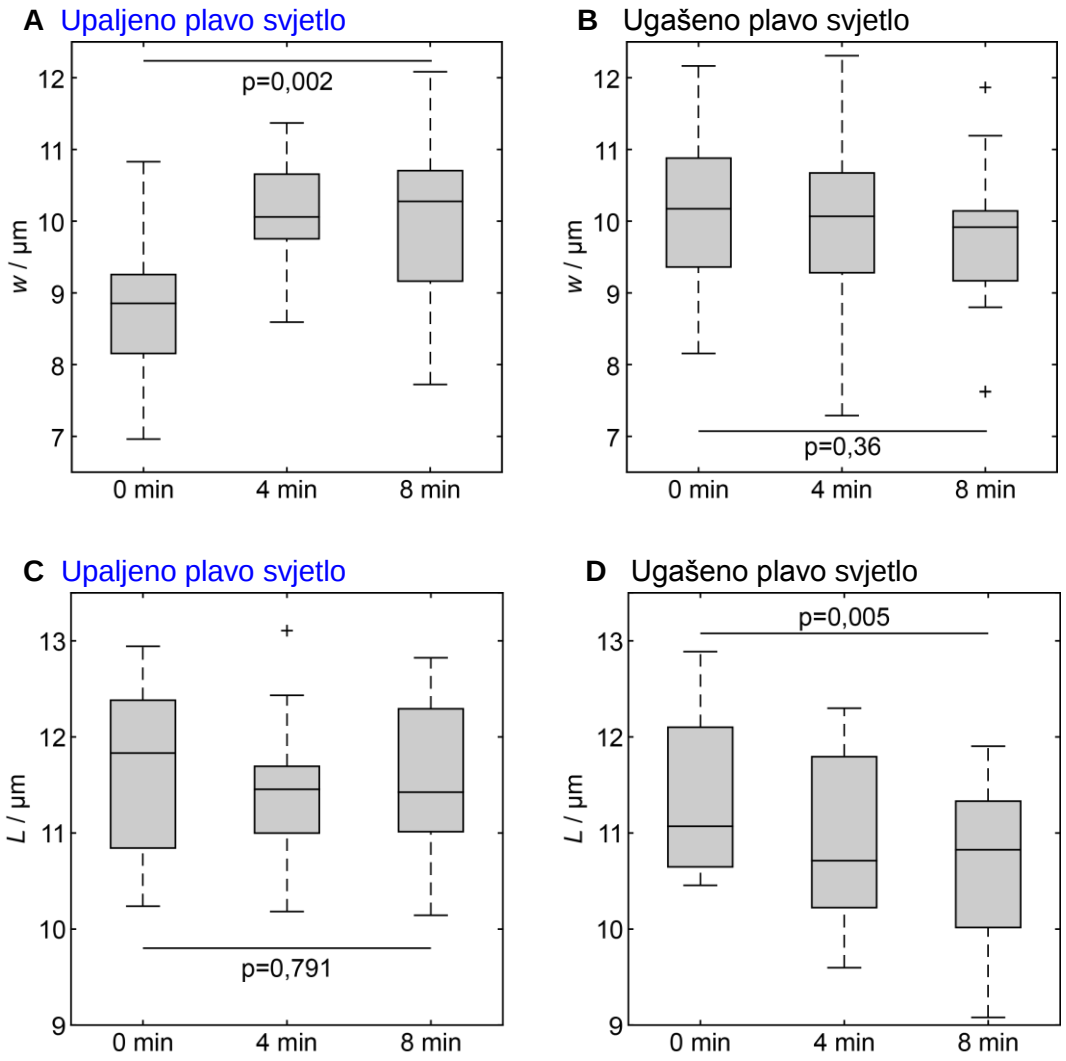


Slika 30. Reverzibilno uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena u stanici s visokom ekspresijom proteina nakon RNA interferencije. (A) Tijekom translokacije proteina PRC1 na mitohondrije pod utjecajem plavog svjetla vrlo brzo se stvaraju agregati mitohondrija te se PRC1 i mitohondriji nakupljaju na polovima diobenog vretena. Plavo svjetlo upaljeno je u *t*=0 min. Stanica prije aktivacije snimljena je oko 10 s prije paljenja plavog svjetla. **(B)** Nakon gašenja plavog svjetla PRC1 se vraća u središnji dio diobenog vretena.

Kako je vidljivo na primjerima stanica u slikama 29 i 30, uslijed uklanjanja proteina PRC1 iz diobenog vretena dolazi do izravnavanja vanjskih k-vlakana slično kao i u eksperimentima opisanima u poglavlju 4.3.3 (slike 29A i 30A). Zanimljivo, prilikom povratka proteina na diobeno vreteno u ovim stanicama nije došlo do ponovnog zaobljivanja diobenog vretena i povratka prvotnog oblika, već se duljina diobenog vretena smanjila (slike 29B i 30B), što je fenotip koji nije bio viđen u eksperimentima s kontrolnom siRNA.

Kako bi se kvantificirala razlika opaženih fenotipa, provedena je analiza oblika diobenog vretena na način opisan u poglavlju 4.3.3 na 12 stanica tretiranih sa siRNA za PRC1. U ovim stanicama početna širina diobenog vretena iznosila je u prosjeku (8,83±0,29) μm, a 8 minuta nakon paljenja plavog svjetla povećala se na (10,01±0,33) μm (slika 31A, p=0,002). Neposredno nakon gašenja plavog svjetla diobeno vreteno bilo je u prosijeku široko (10,13±0,32) μm, a 8 minuta nakon toga širina je iznosila (9,71±0,36) μm (slika 31B, p=0,301). Konačna širina bila je značajno različita od one prije aktivacije (p=0,002). Dakle, uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena uzrokovalo je širenje vretena što je rezultat analogan onome u kontrolnim stanicama (slika 25A). Međutim, vraćanje proteina nije uzrokovalo ponovno smanjenje širine, za razliku od kontrolnih stanica u kojima se širina vratila na početnu vrijednost (slika 25B).

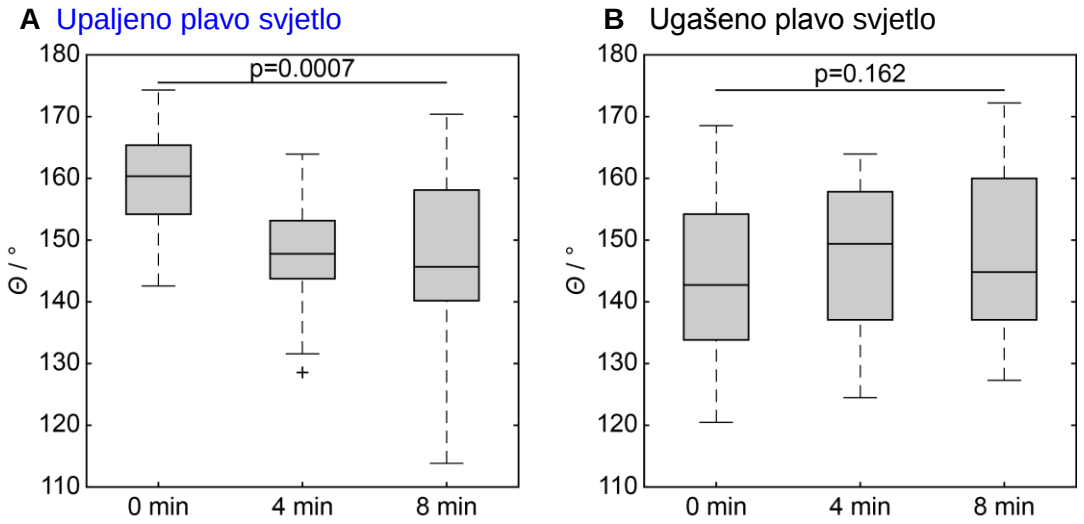
Duljina diobenog vretena prije aktivacije iznosila je u prosjeku (11,68±0,26) μm te se nije značajno promijenila 8 minuta nakon aktivacije kad je iznosila (11,62±0,23) μm (slika 31C, p=0,791). Međutim, nakon gašenja plavog svjetla i vraćanja proteina PRC1 na diobeno vreteno došlo je do značajnog smanjenja duljine s početnih (11,36±0,26) μm na (10,70±0,24) μm nakon 8 minuta (slika 31D, p=0,005). Ovaj rezultat potvrda je fenotipa opaženog u stanicama na slikama 29B i 30B, a predstavlja još jednu razliku u odnosu na kontrolne stanice u kojima nije došlo do značajne promjene duljine diobenog vretena (slika 25C i D).



Slika 31. Širina (A i B) i duljina (C i D) diobenog vretena nakon paljenja (A i C) i gašenja (B i D) plavog svjetla u stanicama tretiranima sa siRNA za endogeni PRC1. Vrijeme na x-osi označava vrijeme nakon paljenja, odnosno gašenja plavog svjetla, n=12 stanica.

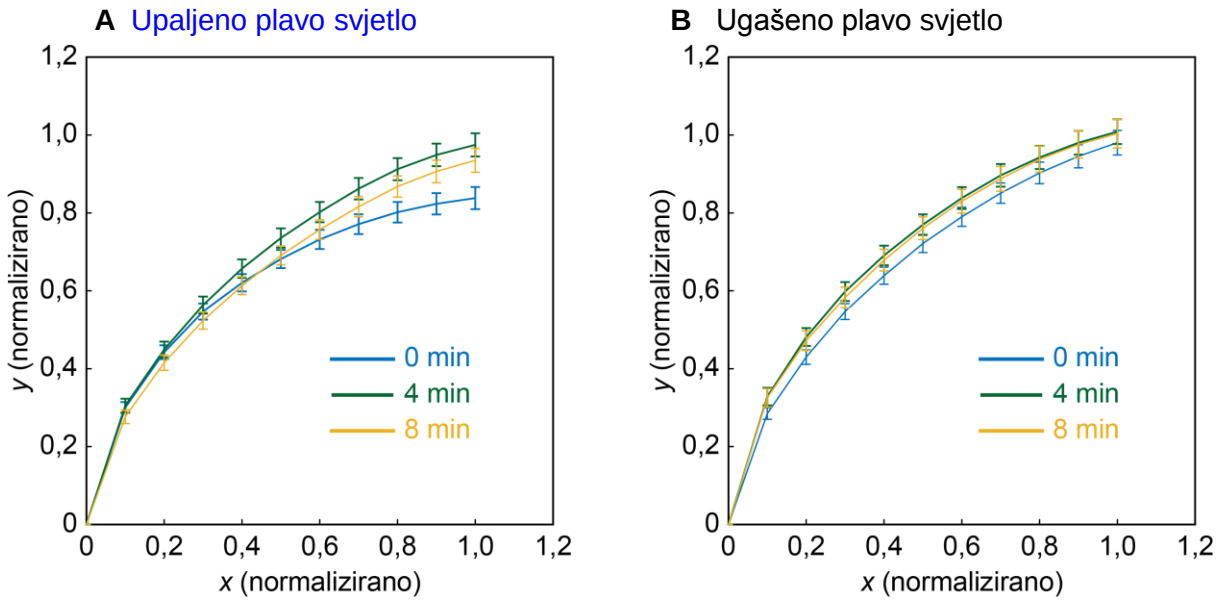
Analizom kuta Θ kvantificirana je promjena u obliku vanjskih k-vlakana nakon uklanjanja i povratka proteina PRC1 u ovim stanicama. Kut između sestrinskih k-vlakana neposredno nakon aktivacije iznosio je u prosjeku (157,3±2,0)°, a uslijed izravnavanja vanjske konture diobenog vretena smanjio se na (142,9±3,1)° 8 minuta nakon aktivacije (slika 32A, p=0,0007). Neposredno nakon gašenja plavog svjetla prosječna vrijednost ovog kuta iznosila je (138,4±3,2)° te se nije značajno promijenila nakon 8 minuta kad je iznosila (143,7±3,3)° (slika 32B, p=0,162). Ovakvi rezultati pokazuju da je uklanjanje proteina PRC1 u ovim

stanicama uzrokovalo izravnavanje vanjskih k-vlakana, jednako kao i u kontrolnim stanicama (slika 26A). Međutim, za razliku od kontrolnih stanica (slika 26B), povratkom proteina PRC1 nije bilo moguće ponovno postići početni oblik diobenog vretena.



Slika 32. Kut između sestrinskih k-vlakana u stanicama tretiranima sa siRNA za endogeni PRC1. (A) Uslijed uklanjanja proteina PRC1 s diobenog vretena kut se povećava zbog izravnavanja vanjskih k-vlakana. **(B)** Povratak proteina PRC1 na diobeno vreteno nakon gašenja plavog svjetla ne uzrokuje promjenu kuta. N=24 kutova u 12 stanica.

Prikaz normalizirane konture vanjskog k-vlakna dan na slici 33 još jednom jasno pokazuje da se kontura izravnava uslijed uklanjanja proteina PRC1 (slika 33A), ali da ne poprima početni oblik nakon vraćanja proteina (slika 33B), za razliku od kontrolnih stanica (slika 27).



Slika 33. Normalizirani oblik vanjskog k-vlakna diobenog vretena u stanicama tretiranima sa siRNA za endogeni PRC1. Normalizacija je provedena na način da se pol diobenog vretena nalazi na poziciji x=0, a vrh k-vlakna na x = 1. N=48 k-vlakana u 12 stanica.

Dakle, tijekom uklanjanja proteina iz diobenog vretena fenotip stanica u kojima je smanjena količina endogeno prisutnog proteina PRC1 sličan je onome opaženom u stanicama s normalnom količinom endogenog proteina. To jest, dolazi do izravnavanja vanjske konture diobenog vretena uslijed čega se povećava širina vretena. Međutim, za razliku od kontrolnih stanica, u ovim stanicama povratkom proteina PRC1 diobeno vreteno ne poprima početni oblik. Moguće objašnjenje ovog rezultata je da su u slučaju postojanja endogenog proteina djelomično sačuvani antiparalelni svežnjevi, a povratkom proteina PRC1 povećava se broj mikrotubula u već postojećim svežnjevima. S druge strane, u slučaju kad je endogeni protein uklonjen, dolazi do potpunog raspadanja antiparalelnih svežnjeva, a s povratkom proteina PRC1 stvaraju se novi antiparalelni svežnjevi na nasumičnim mjestima u središnjem dijelu diobenog vretena. Ovi novi svežnjevi više nisu povezani s k-vlaknima i ne djeluju kao premošćujuća vlakna te ne mogu uzrokovati zakrivljenost diobenog vretena.[37] Umjesto toga, ovakvo nasumično stvaranje mikrotubula uzrokuje smanjenje duljine diobenog vretena.

U ovdje opisanim eksperimentima protein PRC1 vraćen je na diobeno vreteno 10 do 15 minuta nakon početne aktivacije optogenetičkog sustava. U budućim eksperimentima bit će zanimljivo ispitati kako dugotrajno uklanjanje ovog proteina iz vretena utječe na daljnji tijek mitoze. Odnosno, utječe li nedostatak proteina PRC1 na ulazak stanica u anafazu.

Kako je već navedeno, kod interpretacije ovih eksperimenata javljaju se problemi uzrokovani tranzijentnom transfekcijom i korištenjem RNA interferencije za uklanjanje endogenog proteina. Tranzijentna transfekcija uzrokuje heterogenu ekspresiju proteina, a korištenjem RNA interferencije nije moguće u potpunosti otkloniti endogeni protein. Danas su dostupne metode bazirane na CRISPR-Cas9 sustavu koje omogućuju obilježavanje endogenog proteina izravno u genomu stanice.[66] Na ovaj način bilo bi moguće označiti endogeni protein od interesa sa SspB proteinom i fluorescentnim proteinom. Korištenjem ove metode postigla bi se endogena ekspresija proteina kojeg bi bilo moguće u potpunosti ukloniti translokacijom na mitohondrije, što bi znatno olakšalo interpretaciju opaženih fenotipa.

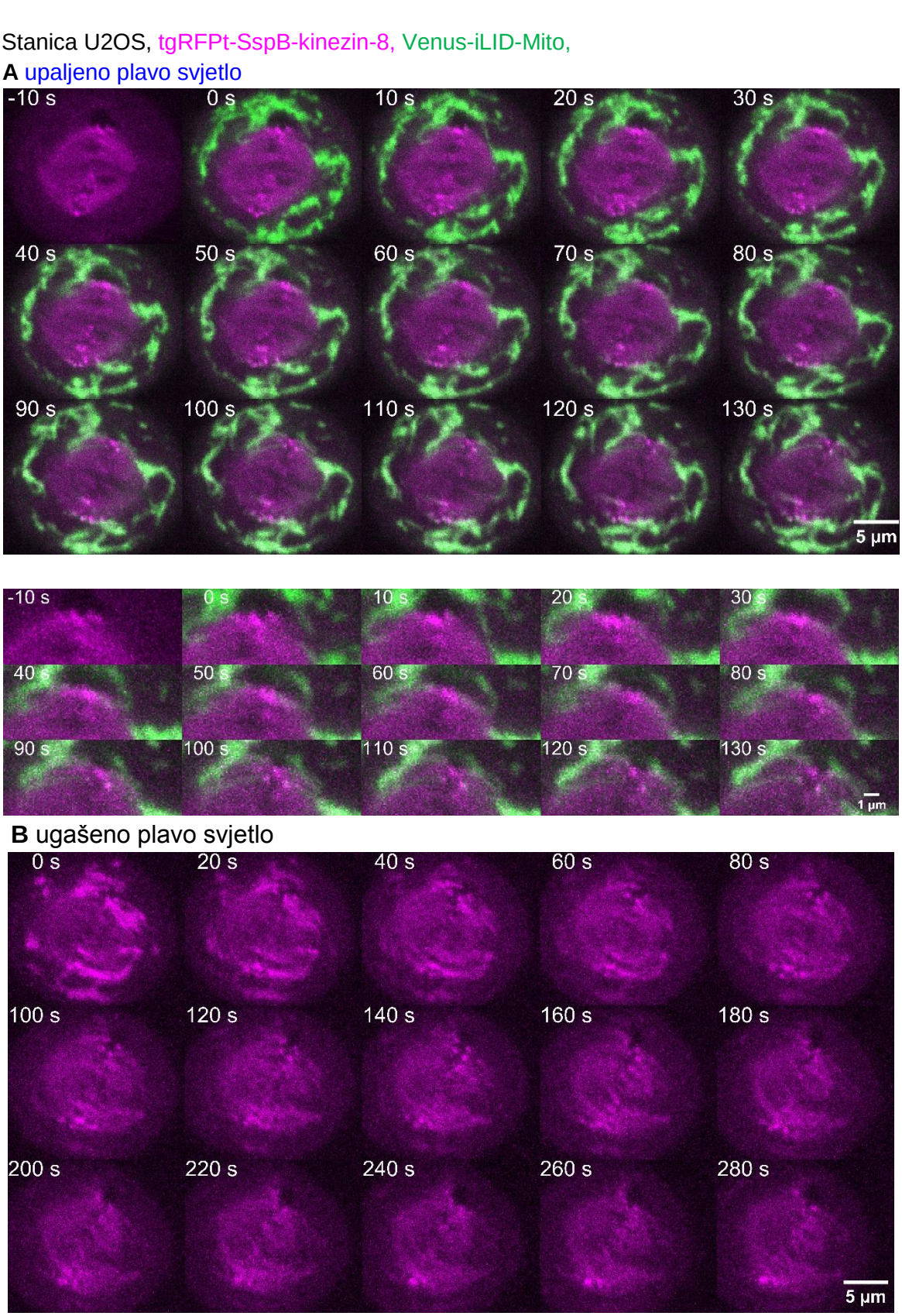
4.4. Vezanje mitohondrija i kinezina-8 uzrokuje transport mitohondrija na diobeno vreteno

Ovdje razvijena metoda isprobana je i za uklanjanje motornog proteina kinezina-8. Kinezin-8 je motorni protein koji se kreće prema (+) krajevima mikrotubula, a u mitozi ima ulogu u kongresiji kromosoma u metafaznu ravninu i reguliranju oscilacija kinetohora u metafazi.[59, 67]

Stanice U2OS transfecirane su plazmidom ptgRFPt-SspB-WT-KIF18a koji omogućuje ekspresiju kinezina-8 obilježenog crvenim fluorescentnim proteinom tgRFPt i proteinom SspB, te Venus-iLID-Mito plazmidom. Uvjeti snimanja bili su jednaki kao i za protein TACC3.

Kako je vidljivo na slici 34A, prije aktivacije optogenetičkog sustava kinezin-8 je lokaliziran na cijelom diobenom vretenu, a najviše na (+) krajevima k-vlakana, pored kinetohora. Nakon paljenja plavog svjetla došlo je do vezanje mitohondrija i kinezina-8. Međutim, vezanje nije uzrokovalo prestanak motorne aktivnosti kinezina-8, već se protein nastavio kretati, transportirajući mitohondrije na (+) krajeve mikrotubula. Nakupljanje mitohondrija bilo je najizraženije na vanjskim k-vlaknima (slika 34A). Nakon gašenja plavog svjetla uslijedila je disocijacija kinezina-8 s mitohondrija (slika 34B).

Ovakav rezultat nije posve neočekivan budući da je već ranije pokazano da je moguće kontrolirati transport mitohondrija i drugih organela pomoću motornih proteina u interfaznim stanicama.[6, 7] Iz ovdje prikazanih rezultata vidljivo je da translokacijom na mitohondrije nije moguće ukloniti kinezin-8 iz diobenog vretena. Ovakvi problemi mogli bi se javljati i kod drugih motornih proteina diobenog vretena koji se usmjereno gibaju po mikrotubulima. Međutim, ponašanje pojedinih proteina nakon vezanja s mitohondrijima teško je predvidjeti već je potrebno eksperimentalno ispitati.



Slika 34. Vezanje mitohondrija i kinezina-8 uzrokuje nakupljanje mitohondrija na (+) krajevima k-vlakna. (A) Upaljeno plavo svjetlo. **(B)** Ugašeno plavo svjetlo.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu razvijena je metoda koja omogućuje brzo i reverzibilno uklanjanje proteina iz diobenog vretena korištenjem plavog svjetla. Proteini su uklonjeni iz diobenog vretena translokacijom na mitohondrije pri čemu je korištena metoda dimerizacije inducirane svjetlom. Uklanjanje i vraćanje proteina bilo je moguće inducirati na vremenskim skalama od nekoliko minuta, što omogućuje kontrolu proteina u vremenu trajanja metafaze mitoze. Razvijena metoda primijenjena je za proučavanje proteina TACC3 i PRC1 koji su potrebni za formiranje i održavanje svežnjeva mikrotubula u diobenom vretenu. Protein TACC3 veže paralelne mikrotubule, a PRC1 antiparalelne.

Pokazano je da je korištenjem ove metode moguće reverzibilno ukloniti protein TACC3 te je određena kinetika kojom se odvijaju procesi uklanjanja i povratka proteina. Uklanjanje proteina TACC3 iz diobenog vretena pod utjecajem plavog svjetla prati kinetiku prvog reda, a vraćanje proteina na diobeno vreteno može se opisati modelom koji uključuje dvije uzastopne reakcije. Brzina kojom dolazi do translokacije proteina na mitohondrije veća je u odnosu na prethodno opisanu metodu u kojoj je korištena kemijski inducirana dimerizacija.

Primjenom razvijene metode za reverzibilno uklanjanje proteina PRC1 iz diobenog vretena bilo je moguće inducirati raspadanje i ponovno formiranje antiparalelnih svežnjeva mikrotubula u središnjem dijelu vretena. Uz to, pokazano je da količina ovog proteina značajno utječe na oblik diobenog vretena. Naime, uklanjanje proteina iz diobenog vretena uzrokovalo je širenje vretena i izravnavanje vanjskih k-vlakana. Ovaj fenotip bilo je moguće revertirati u slučaju kad je u vretenu još uvijek postojao endogeni PRC1, dok isto nije bilo moguće u eksperimentima u kojima je količina endogenog proteina smanjena korištenjem RNA interferencije.

Korištenjem metode za vezanje mitohondrija i motornog proteina kinezina-8 nije bilo moguće ukloniti protein iz diobenog vretena, već je ovakvo vezanje uzrokovalo transport mitohondrija na diobeno vreteno. Dakle, vezanje proteina na mitohondrij nije onemogućilo

motornu aktivnost proteina, što ukazuje na postojanje ograničenja ove metode kod proučavanja motornih proteina.

Prikazani rezultati pokazuju da je ovdje razvijena metoda primjenjiva za proučavanje proteina diobenog vretena, iako će primjenjivost metode ovisiti o svojstvima ispitivanog proteina. Budući eksperimenti uključivat će detaljniju karakterizaciju ovdje opaženih fenotipa, kao i primjenu metode na druge proteine diobenog vretena.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

APC/C – ubikvitin ligaza staničnog ciklusa (engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*)

Cdk - kinaze ovisne o ciklinu (engl. *cyclin dependent kinases*)

ch-TOG - engl. *colonic and hepatic tumour overexpressed gene*

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

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksinukleotid trifosfat

FBS – fetalni serum goveda (engl. *Fetal bovine serum*)

FRB domena – proteinska domena koja veže FKBP na koji je vezan rapamicin (engl. *FKBP and rapamycin-binding domain*)

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

GTP - gvanozin-5'-trifosfat

GDP - gvanozin-5'-difosfat

iLID – protein dobiven fuzijom SspB proteina i LOV domene (engl. *improved Light-Inducible Dimer*)

k-vlakna – kinetohorna vlakna

L-15 – bezbojni medij za mikroskopiranje (engl. *Leibovitz's medium*)

LOV domena – proteinska domena osjetljiva na plavo svjetlo (engl. *Light-oxygen-voltage-sensing domain*)

MAP - proteini vezani za mikrotubule (engl. *MAPs, microtubule associated proteins*)

mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger RNA*)

NGS – normalni serum koze (engl. *Normal Goat Serum*)

PBS – fosfatni pufer(engl. *phosphate buffered saline*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PRC1 - protein regulator citokineze 1 (engl. *protein regulator of cytokinesis 1*)

RNA – ribonukleinska kiselina

RNAi – RNA interferencija

SFC – ubikvitin ligaza staničnog ciklusa koja se sastoji od podjedinica *Skp1, Cullin i F-box*

shRNA – mala RNA u obliku ukosnice (engl. *short hairpin RNA*)

siRNA – mala interferirajuća RNA (engl. *small interfering RNA*)

SspB – protein koji veže SsrA sekvencu (engl. *Stringent starvation protein B*)

SsrA –aminokiselinska sekvenca AANDENYALAA

TACC3 - engl. *transforming acidic coiled-coil protein*

tgRFPt – crveni fluorescentni protein (engl. *Tag red fluorescent protein T)*

U2OS stanice – ljudske stanice osteosarkoma

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. A.W. Murray, *A brief history of error*, *Nat. Cell Biol.* **13** (2011) 1178-1182.
2. N. Pavin, I.M. Tolić, *Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle*, *Annu. Rev. Biophys.* **45** (2016) 279-298.
3. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York, 2000.
4. Y.I. Wu, D. Frey, O.I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, K.M. Hahn, *A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells*, *Nature* **461** (2009) 104-108.
5. A. Levskaya, O.D. Weiner, W.A. Lim, C.A. Voigt, *Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction*, *Nature* **461** (2009) 997-1001.
6. P. van Bergeijk, M. Adrian, C.C. Hoogenraad, L.C. Kapitein, *Optogenetic control of organelle transport and positioning*, *Nature* **518** (2015) 111-114.
7. L. Duan, D. Che, K. Zhang, Q. Ong, S. Guo, B. Cui, *Optogenetic Control of Molecular Motors and Organelle Distributions in Cells*, *Chem. Biol.* **22** (2015) 671-682.
8. M.J. Kennedy, R.M. Hughes, L.a. Peteya, J.W. Schwartz, M.D. Ehlers, C.L. Tucker, *Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells*, *Nat. Methods* **7** (2010) 973-975.
9. G. Guntas, R.a. Hallett, S.P. Zimmerman, T. Williams, H. Yumerefendi, J.E. Bear, B. Kuhlman, *Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112** (2015) 112-117.
10. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 2007.
11. A. Musacchio, A. Desai, *A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function*, *Biology* **6** (2017).

12. K.L. Wendell, L. Wilson, M.A. Jordan, *Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes, J. Cell Sci.* **104** (1993) 261-274.
13. B.F. McEwen, G.K. Chan, B. Zubrowski, M.S. Savoian, M.T. Sauer, T.J. Yen, *CENP-E is essential for reliable bioriented spindle attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells, Mol Biol Cell* **9** (2001) 2776-2789.
14. J.M. Scholey, G. Civelekoglu-Scholey, I. Brust-Mascher, *Anaphase B, Biology* **5** (2016).
15. C.G. Jensen, *Dynamics of spindle microtubule organization: kinetochore fiber microtubules of plant endosperm, J. Cell Biol.* **92** (1982) 540-558.
16. R. Ohi, M.L. Coughlin, W.S. Lane, T.J. Mitchison, *An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a KinI kinesin, Dev. Cell* **5** (2003) 309-321.
17. K.L. McDonald, E.T. O'Toole, D.N. Mastronarde, *Kinetochore microtubules in PTK cells., J. Cell Biol.* **118** (1992) 369-383.
18. J. Kajtez, A. Solomatina, M. Novak, B. Polak, K. Vukušić, J. Rudiger, G. Cojoc, A. Milas, I. Šumanovac Šestak, P. Risteski, F. Tavano, A.H. Klemm, E. Roscioli, J. Welburn, D. Cimini, M. Glunčić, N. Pavin, I.M. Tolić, *Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores, Nat. Commun.* **7** (2016).
19. A. Milas, I.M. Tolić, *Relaxation of interkinetochore tension after severing of a k-fiber depends on the length of the k-fiber stub, Matters Select* (2016).
20. B. Polak, P. Risteski, S. Lesjak, I.M. Tolić, *PRC1-labeled microtubule bundles and kinetochore pairs show one-to-one association in metaphase, EMBO Rep.* **18** (2017) 217-230.
21. F.M. Nixon, T.R. Honnor, N.I. Clarke, P. Georgina, A.J. Beckett, A.M. Johansen, J.A. Brettschneider, A. Prior, S.J. Royle, *Microtubule organization within mitotic spindles revealed by serial block face scanning EM and image analysis, J. Cell Sci.* (2017).
22. J. Simunić, I.M. Tolić, *Mitotic Spindle Assembly: Building the Bridge between Sister K-Fibers, Trends Biochem. Sci.* **41** (2016) 824-833.

23. D.G. Booth, F.E. Hood, I.A. Prior, S.J. Royle, *A TACC3/ch-TOG/clathrin complex stabilises kinetochore fibres by inter-microtubule bridging*, *EMBO J.* **30** (2011) 906-919.
24. L.P. Cheeseman, E.F. Harry, A.D. McAinsh, I.a. Prior, S.J. Royle, *Specific removal of TACC3-ch-TOG-clathrin at metaphase deregulates kinetochore fiber tension*, *J. Cell Sci.* **126** (2013) 2102-2113.
25. F.M. Nixon, C. Gutiérrez-Caballero, F.E. Hood, D.G. Booth, I.A. Prior, S.J. Royle, *The mesh is a network of microtubule connectors that stabilizes individual kinetochore fibers of the mitotic spindle*, *eLife* **4** (2015) 1-21.
26. S.J. Royle, *The role of clathrin in mitotic spindle organisation*, *J. Cell Sci.* **125** (2012) 19-28.
27. M.S. Robinson, D.A. Sahlender, S.D. Foster, *Rapid Inactivation of Proteins by Rapamycin-Induced Rerouting to Mitochondria*, *Dev. Cell* **18** (2010) 324-331.
28. P. Bieling, I.A. Telley, T. Surrey, *A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps*, *Cell* **142** (2010) 420-432.
29. R. Subramanian, E.M. Wilson-Kubalek, C.P. Arthur, M.J. Bick, E.A. Campbell, S.A. Darst, R.A. Milligan, T.M. Kapoor, *Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein*, *Cell* **142** (2010) 433-443.
30. C. Mollinari, J.P. Kleman, W. Jiang, G. Schoehn, T. Hunter, R.L. Margolis, *PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone*, *J. Cell Biol.* **157** (2002) 1175-1186.
31. C. Zhu, E. Lau, R. Schwarzenbacher, E. Bossy-Wetzel, W. Jiang, *Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 6196 – 6201.
32. S. Dumont, T.J. Mitchison, *Force and Length in the Mitotic Spindle*, *Curr. Biol.* **19** (2009) 749-761.
33. P.A. McNeill, M.W. Berns, *Chromosome behavior after laser microirradiation of a single kinetochore in mitotic PtK2 cells*, *J. Cell Biol.* **88** (1981) 543-553.
34. J.C. Waters, R.V. Skibbens, E.D. Salmon, *Oscillating mitotic newt lung cell kinetochores are, on average, under tension and rarely push*, *J. Cell Sci.* **109** (1996) 2823-2831.

35. K. Bloom, A. Joglekar, *Towards building a chromosome segregation machine*, *Nature* **463** (2010) 446-456.
36. L. Nezi, A. Musacchio, *Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint*, *Curr. Opin. Cell Biol.* **21** (2009) 785-795.
37. I.M. Tolić, N. Pavin, *Bridging the gap between sister kinetochores*, *Cell Cycle* **15** (2016) 1169-1170.
38. S.J. Royle, N.A. Bright, L. Lagnado, *Clathrin is required for the function of the mitotic spindle*, *Nature* **434** (2005) 1152-1157.
39. F.M. Brodsky, *Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28** (2012) 309-336.
40. T.U. Mayer , T.M. Kapoor, S.J. Haggarty, R.W. King, S.L. Schreiber, *Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen*, *Science* **286** (1999) 971-974.
41. K. Deisseroth, *Optogenetics*, *Nat. Methods* **8** (2011) 26-29.
42. G.P. Dugué, W. Akemann, T. Knöpfel, *A comprehensive concept of optogenetics*, *Prog. Brain Res.* **196** (2012) 1-28.
43. D. Tischer, O.D. Weiner, *Illuminating cell signalling with optogenetic tools*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** (2014) 551-5518.
44. K. Zhang, B. Cui, *Optogenetic control of intracellular signaling pathways*, *Trends Biotechnol.* **33** (2015) 92-100.
45. S.R. Adams, R.Y. Tsien, *Controlling cell chemistry with caged compounds*, *Annu. Rev. Physiol.* **55** (1993) 755-784.
46. G.C. Ellis-Davies, *Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology*, *Nat. Methods* **4** (2007) 619-628.
47. C.L. Tucker, J.D. Vrana, M.J. Kennedy, *Tools for controlling protein interactions using light*, *Curr. Protoc. Cell Biol.* **64** (2014).
48. J.E. Toettcher, C.a. Voigt, O.D. Weiner, W.a. Lim, *The promise of optogenetics in cell biology: interrogating molecular circuits in space and time*, *Nat. Methods* **8** (2011) 35-38.
49. K. Ishikawa, Y. Tamura, S. Maruta, *Photocontrol of mitotic kinesin Eg5 facilitated by thiol-reactive photochromic molecules incorporated into the loop L5 functional loop*, *J. Biochem.* **155** (2014) 195-206.

50. E.R. Ballister, C. Aonbangkhen, A.M. Mayo, M.A. Lampson, D.M. Chenoweth, *Localized light-induced protein dimerization in living cells using a photocaged dimerizer*, *Nat. Commun.* **5** (2014).
51. A. Pudasaini, K.K. El-Arab, B.D. Zoltowski, *LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling*, *Front. Mol. Biosci.* **2** (2015).
52. C. Renicke, D. Schuster, S. Usherenko, L.-O. Essen, C. Taxis, *A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function*, *Chem. Biol.* **20** (2013) 619-626.
53. D. Strickland, K. Moffat, T.R. Sosnick, *Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** (2008) 10709-10714.
54. D. Strickland, Y. Lin, E. Wagner, C.M. Hope, J. Zayner, C. Antoniou, T.R. Sosnick, E.L. Weiss, M. Glotzer, *TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology*, *Nat. Methods* **9** (2012) 379-384.
55. X.X. Zhou, H.K. Chung, A.J. Lam, M.Z. Lin, *Optical Control of Protein Activity by Fluorescent Protein Domains*, *Science* **338** (2012) 810-814.
56. K.C. Keiler, P.R. Waller, R.T. Sauer, *Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA*, *Science* **271** (1996) 990-993.
57. I. Levchenko, M. Seidel, R.T. Sauer, T.A. Baker, *A Specificity-Enhancing Factor for the ClpXP Degradation Machine*, *Science* **289** (2000) 2354-2356.
58. *In-Fusion HD Cloning Kit User Manual*, Takara Bio USA, Inc., Mountain View, 2016
59. J. Stumpff, G. von Dassow, M. Wagenbach, C. Asbury, L. Wordeman, *The Kinesin-8 Motor Kif18A Suppresses Kinetochore Movements to Control Mitotic Chromosome Alignment*, *Dev. Cell* **14** (2008) 252-262.
60. V. Magidson, A. Khodjakov, *Circumventing photodamage in live-cell microscopy*, *Methods Cell Biol.* **114** (2013) 1-15.
61. J.E. House, *Principles of Chemical Kinetics*, Elsevier, Burlington, 2007.
62. G. Lukinavičius, L. Reymond, E. D'Este, A. Masharina, F. Göttfert, H. Ta, A. Güther, M. Fournier, S. Rizzo, H. Waldmann, C. Blaukopf, C. Sommer, D.W. Gerlich, H.-D. Arndt, S.W. Hell, K. Johnsson, *Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton*, *Nat. Methods* **11** (2014) 731-733.

63. Y. Kurasawa, W.C. Earnshaw, Y. Mochizuki, N. Dohmae, K. Todokoro, *Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation, EMBO J.* **23** (2004) 3237-3248.

64. C. Zhu, W. Jiang, *Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 343-348.

65. G. Lukinavičius, C. Blaukopf, E. Pershagen, A. Schena, E. Derivery, M. Gonzalez-Gaitan, E.D. Este, S.W. Hell, D.W. Gerlich, K. Johnsson, *A far-red DNA stain for live-cell nanoscopy, Nat. Commun.* **61** (2015) 3-5.

66. J.A. Doudna, E. Charpentier, *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, Science* **346** (2014).

67. M.I. Mayr, S. Hummer, J. Bormann, T. Gruner, S. Adio, G. Woehlke, T.U. Mayer, *The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression, Curr. Biol.* **17** (2007) 488-498.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ana Milas

Datum rođenja: 11. srpnja 1993.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2000–2008	Osnovna škola Stenjevec, Zagreb
2008–2012	Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb
2012–2015	Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2013	Posebna Rektorova nagrada za sudjelovanje u organizaciji 6. Otvorenog dana Kemijskog odsjeka
2017	Rektorova nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici za sudjelovanje u organizaciji Simpozija studenata kemičara
2010-2012	Stipendija Grada Zagreba za nadarene učenike
2012-2017	Stipendija Grada Zagreba za nadarene studente

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013	6. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2014	7. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2015	8. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2016	Otvoreni dan Instituta Ruđer Bošković
2017	Otvoreni dan Instituta Ruđer Bošković

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. **A. Milas**, N. Pavin, I.M. Tolić, *Sliding of microtubules in the bridging fiber segregates chromosomes by creating poleward flux of the attached k-fibers,* 13th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, Zadar-Split, Hrvatska
2. **A. Milas**, N. Pavin, I.M. Tolić, *Sliding of microtubules in the bridging fiber segregates chromosomes by creating poleward flux of the attached k-fibers,* 12th International Congress of Cell Biology, Prag, Češka
3. **A. Milas**, N. Pavin, I.M. Tolić, *Sliding of microtubules in the bridging fiber segregates chromosomes by creating poleward flux of the attached k-fibers,* EMBO | EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems, Heidelberg, Njemačka

Publikacije

1. J. Kajtez, A. Solomatina, M. Novak, B. Polak, K. Vukušić, J. Rudiger, G. Cojoc, **A. Milas**, I. Šumanovac Šestak, P. Risteski, F. Tavano, A.H. Klemm, E. Roscioli, J. Welburn, D. Cimini, M. Glunčić, N. Pavin, I.M. Tolić, *Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores, Nat. Commun.* **7** (2016).
2. **A. Milas**, I.M. Tolić, *Relaxation of interkinetochore tension after severing of a k-fiber depends on the length of the k-fiber stub, Matters Select* (2016).

A ja samo sam htjela oca djeci….

Jelena Rozga, 2010