

# Premošćujući mikrotubuli i generiranje sila u mitozu

---

**Risteski, Patrik**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:947477>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**PREMOŠČUJUĆI MIKROTUBULI I GENERIRANJE SILA U  
MITOZI**

**BRIDGING MICROTUBULES AND GENERATION OF  
FORCES IN MITOSIS**

**SEMINARSKI RAD**

Patrik Risteski

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2015.

## Sadržaj

<b>1. Sažetak</b>	
1.1. Hrvatska verzija - Sažetak .....	2
1.2. English version - Abstract .....	2
<b>2. Uvod</b> .....	3
<b>3. Eksperimentalna opažanja</b>	
3.1. Vizualizacija premošćujućih mikrotubula .....	5
3.2. Povezanost premošćujućih mikrotubula sa sestrinskim kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama .....	7
3.3. Determinacija broja mikrotubula u premošćujućem vlaknu .....	10
3.4. Antiparalelnost premošćujućeg vlakna .....	12
3.5. Aproksimacija oblika silama kompresije i tenzije .....	14
3.6. Točka spajanja premošćujućih mikrotubula i kinetohornog vlakna .....	17
3.7. Fizikalni model .....	18
3.8. Povećanje sile na polovima diobenog vretena povećanjem debljine premošćujućeg vlakna .....	20
<b>4. Rasprava</b> .....	23
<b>5. Literatura</b> .....	26

## **1. Sažetak**

### **1.1. Hrvatska verzija – Sažetak**

Na početku stanične diobe stanica konstruira diobeno vreteno, složeni citoskeletni mehanizam sastavljen od mikrotubula i proteina povezanih s mikrotubulima. Dosadašnji model mitotskog diobenog vretena definira dvije odvojene skupine mikrotubula; kinetohorne i ne-kinetohorne mikrotubule. Tijekom metafaze, sile na kinetohorama su uzrokovane kinetohornim mikrotubulima koji čine kinetohorna vlakna. Međutim, ne-kinetohorni mikrotubuli su uočeni u blizini kinetohora u metafazi. Ovaj rad sumira sva istraživanja temeljena na novoj podskupini antiparalelnih mikrotubula, nazvanih premošćujući mikrotubuli, koji premošćuju regiju ispod sestrinskih kinetohora i ostvaruju lateralne poveznice između odgovarajućih kinetohornih vlakana. Premošćujući mikrotubuli su vizualizirani konfokalnom mikroskopijom u stanicama HeLa i PtK1. Kako bi se premošćujući mikrotubuli mogli razlikovati od ostalih ne-kinetohornih mikrotubula te kako bi se ispitale sile koje premošćujući snop generira, osmišljen je protokol laserske ablacije. Konstruiran je fizikalni model u kojem premošćujući snop osigurava mehaničku otpornost na tenziju i kompresiju unutar kinetohornog vlakna. Rezultati istraživanja indiciraju uključenost nove podskupine mikrotubula u preciznu segregaciju i organizaciju kromosoma uravnotežavanjem sila unutar mitotskog diobenog vretena.

### **1.2. English version – Abstract**

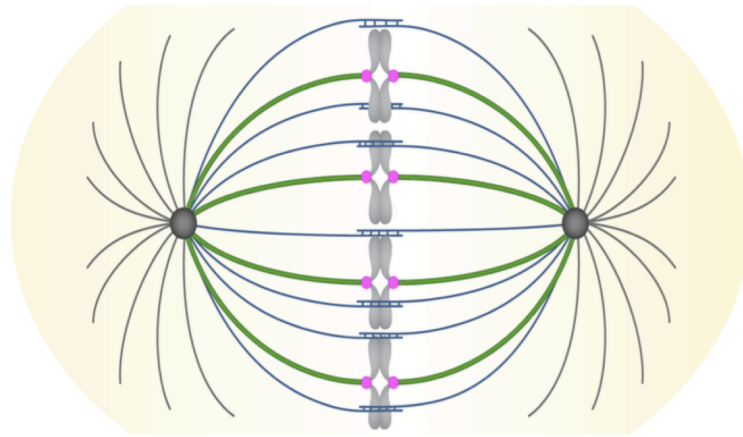
At the onset of division, cell constructs a spindle, complex cytoskeletal mechanism formed with microtubules and microtubule-associated proteins. The current model of the mitotic spindle defines two separate populations of microtubules; kinetochore and non-kinetochore microtubules. During metaphase, forces on the kinetochores are exerted by kinetochore fibers consisting of kinetochore microtubules. However, non-kinetochore

microtubules have been observed in the vicinity of the kinetochores in metaphase. This paper summarizes all research based on subpopulation of antiparallel microtubules, named bridging microtubules that span the region under sister kinetochores and facilitate a lateral connection between corresponding kinetochore fibers. Bridging microtubules have been visualized by confocal microscopy in HeLa and PtK1 cells. In order to distinct bridging microtubules from other non-kinetochore microtubules and to test forces that bridging bundle generates, laser ablation assay was developed. Physical model in which bridging bundle provides mechanical resistance to the tension and compression within the kinetochore fibers was constructed. Results indicate that the new subpopulation of microtubules is responsible for precise chromosome segregation and organization by balancing forces within mitotic spindle.

## **2. Uvod**

U ranoj mitozu stanica, nakon što su se kromosomi replicirali, započinje dramatična promjena. Zbog potrebe za ispravnom segregacijom dviju kopija svakog repliciranog kromosoma u dvije stanice kćeri dolazi do promjena u dinamici, promjene srednje duljine i pojačanja nukleacije citoskeletnih elemenata - mikrotubula, u regijama oko kondenziranog kromosoma. Interfazna masa mikrotubula koja je prožimala citoplazmu reorganizira se u mitotsko diobeno vreteno. Konstrukcija koherentnog diobeno vretena omogućena je koordiniranom aktivnošću dinamičnih mikrotubula i motornih proteina. Povezivanje mikrotubula s kromosomima ostvaruje se pomoću kinetohora, proteinskih struktura asociраних s centromernim regijama kromosomske DNA (Cheeseman i Desai, 2008). Do metafaze mitoze svi kromosomi su biorijentirani što znači da su sestrinske kinetohore isključivo povezane sa snopovima mikrotubula koji proizlaze sa suprotnih polova stanice. Mikrotubuli su odgovorni za postrojavanje kromosoma u središnji dio diobeno vretena generiranjem sila na području sučelja kinetohora-diobeno vreteno (Li i Murray, 1991; Nezi i Mussacchio, 2009), a u anafazi i za segregaciju komplemenata genoma.

Mikrotubuli diobenog vretena mogu se podijeliti u dvije skupine; kinetohorne i ne-kinetohorne mikrotubule (Slika 1). Kinetohorni mikrotubuli su paralelni mikrotubuli koji se polimeriziraju iz centrosoma te pričvršćuju na kinetohore kao kinetohorna vlakna. Za razliku od kinetohornih, ne-kinetohorni mikrotubuli pretežito međusobno interagiraju stvarajući preklapajuće regije kao antiparalelni snopovi. Pretpostavljeno je da jedino kinetohorna vlakna sudjeluju u generiranju sila tijekom metafaze (Cheerambathur i Desai, 2014), međutim elektronskom mikroskopijom uočena su ne-kinetohorna vlakna u blizini kinetohornih vlakana i između kinetohora (Jensen, 1982; McDonald i sur., 1992; Ohi i sur., 2003) što otvara različite mogućnosti međusobnog povezivanja kinetohornih vlakana i uravnotežavanja sila u diobenom vretenu, posebice u regiji kinetohora.



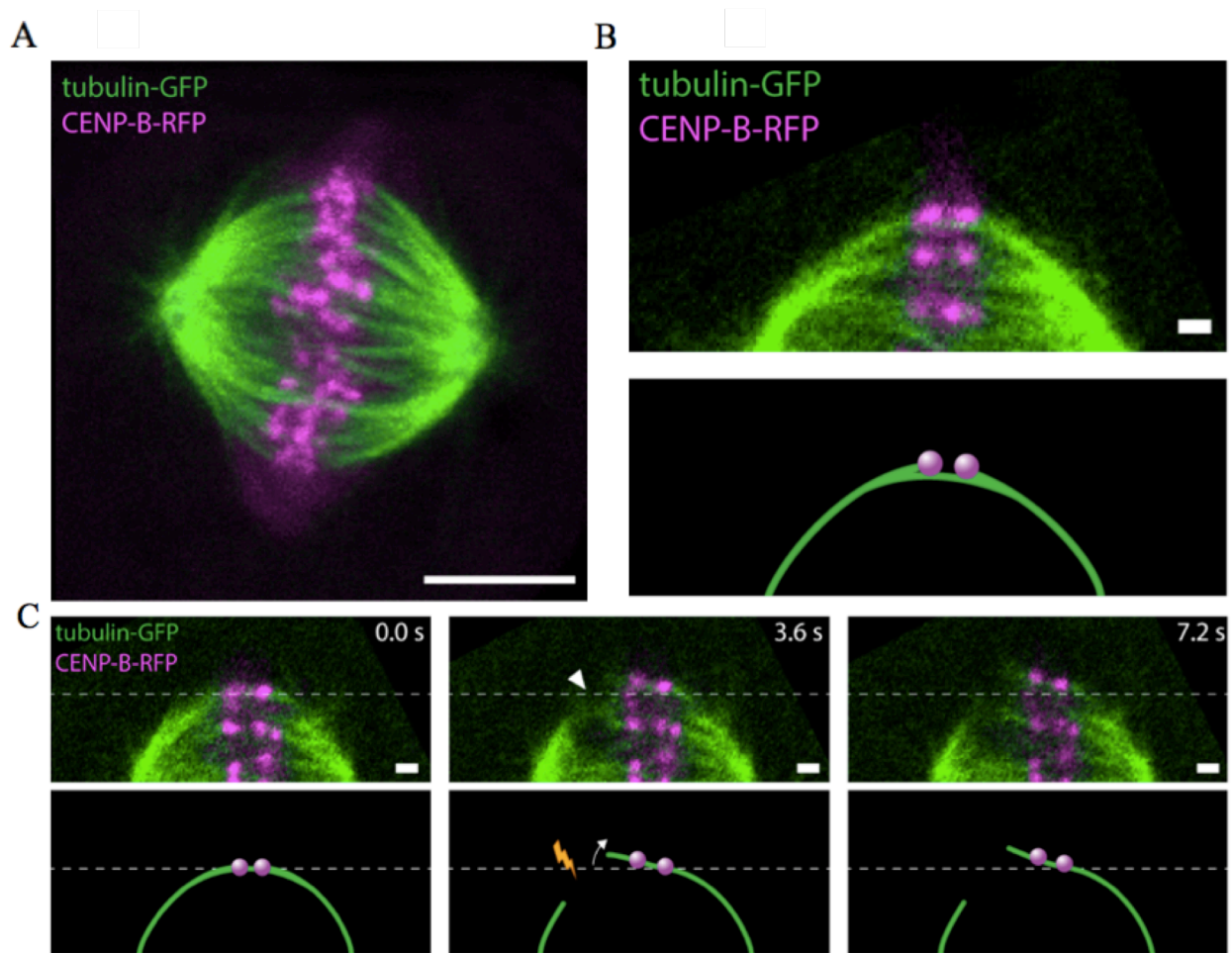
**Slika 1. Klasični model arhitekture metafaznog diobenog vretena** (Preuzeto iz Kajtez, 2014). Različite skupine mikrotubula naznačene su različitim bojama. Kinetohorni mikrotubuli (zeleno) povezuju kromosome s polovima diobenog vretena preko kinetohora (ljubičasto). Ne-kinetohorni mikrotubuli su interpolarni (plavo) i astralni (sivo). Interpolarni mikrotubuli (plavo) proizlaze s oba pola diobenog vretena i međusobno interagiraju u središnjem dijelu diobenog vretena stvarajući antiparalelne nizove. Astralni mikrotubuli (sivo) rastu radijalno od polova diobenog vretena i stvaraju poveznice sa staničnim korteksom.

### 3. Eksperimentalna opažanja

#### 3.1. Vizualizacija premošćujućih mikrotubula

U svrhu identifikacije komponente diobenog vretena koja je uočena u prethodnim istraživanjima, s potencijalno važnom ulogom u održavanju sila u ravnoteži, definirana je jedinica diobenog vretena kao sustav sastavljen od sestrinskih kinetohora povezanih preko mikrotubula s centrosomima. Strukture od interesa vizualizirane su konfokalnom mikroskopijom u stanicama HeLa koje stabilno ekspimiraju tubulin obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (GFP-tubulin) i centromerni protein B obilježen monomernim crvenim fluorescentnim proteinom (mRFP-CENP-B) (Slika 2A). Istraživanje se usredotočilo na krajnju jedinicu diobenog vretena zbog smanjenja utjecaja signala susjednih kinetohora, kao i obližnjeg dijela diobenog vretena iz iste ili susjednih z-ravnina, ravnina snimljenih duž z-osi koja je okomita na x- i y-os. Analizom stanica za dodatne komponente koje mogu pridonijeti uravnotežavanju sila u diobenom vretenu uz jaki signal GFP-tubulina duž kinetohornih vlakana, uočen je i slabi signal ne-kinetohornih mikrotubula ispod sestrinskih kinetohora koji povezuje kinetohorna vlakna vezana na odgovarajuće kinetohore (Slika 2B).

Uočena vrsta ne-kinetohornih mikrotubula je zbog karakterističnog izgleda mosta između dva kinetohorna vlakna i velike blizine sestrinskim kinetohorama svrstana u novu vrstu nazvanu premošćujući mikrotubuli, a vlakna koja tvore premošćujuća vlakna (Kajtez, 2014; Rüdiger, 2014; Solomatina, 2014). Određivanjem pozicije premošćujućeg vlakna na n=23 stanica, premošćujuće vlakno je locirano na udaljenosti  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$  od središta između sestrinskih kinetohora u smjeru okomitom na dugu os diobenog vretena odnosno u smjeru središta diobenog vretena (Kajtez, 2014).



**Slika 2. Povezanost premošujućih mikrotubula sa sestrinskim kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama u metafaznoj stanici HeLa (Preuzeto iz Kajtez, 2014).**

- (A) Diobeno vreteno kompletne stanice HeLa s ekspresijom GFP-tubulina (zeleno) i mRFP-CENP-B (ljubičasto). Kinetohorni i ne-kinetohorni mikrotubuli diobenog vretena obojeni su zeleno, a kinetohore ljubičasto. Skala prikazuje 5  $\mu\text{m}$ .
- (B) Diobeno vreteno dijela stanice HeLa s ekspresijom GFP-tubulina (zeleno) i mRFP-CENP-B (ljubičasto). Fokus je na krajnjoj jedinici diobenog vretena. Premošujuće vlakno je vidljivo ispod krajnjeg para kinetohora (gore: spojeni zeleni i ljubičasti kanal, dolje: shema). Skala prikazuje 1  $\mu\text{m}$ .
- (C) Zajedničko kretanje premošujućeg vlakna, intaktnog odnosno ne-ablatiranog kinetohornog vlakna, dijela ablatiranog kinetohornog vlakna vezanog na



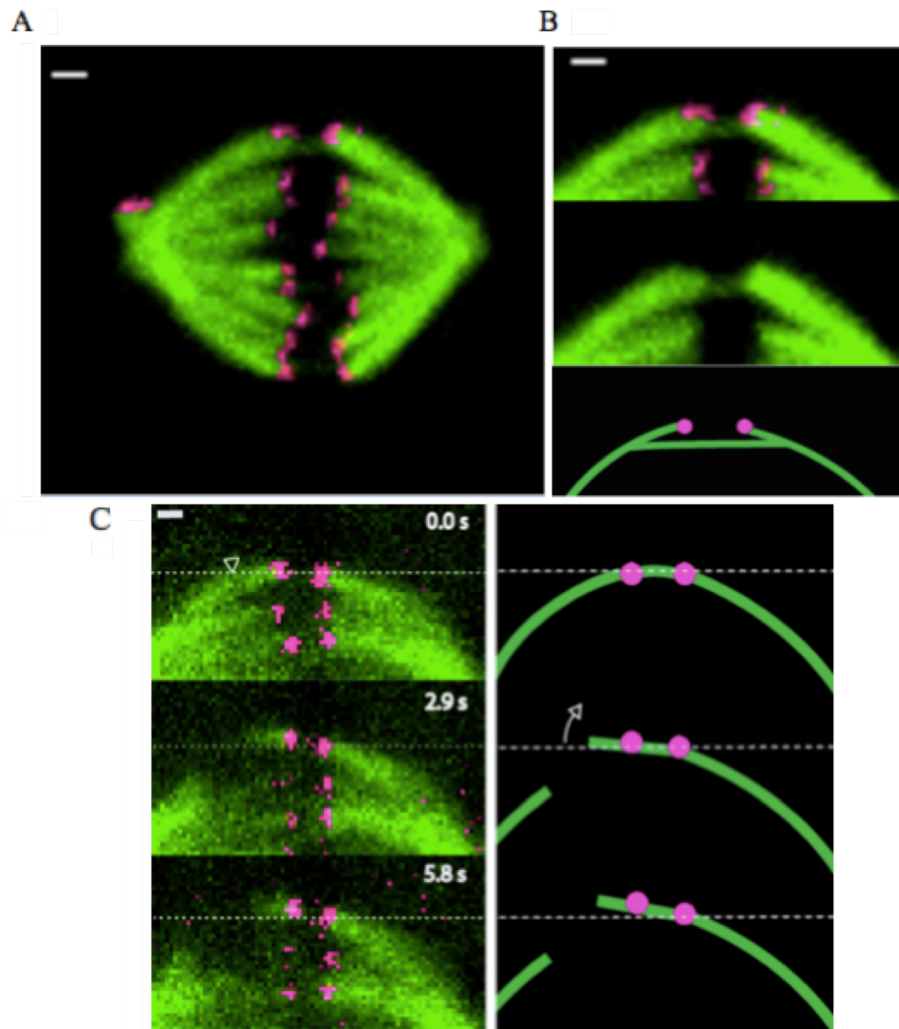
kinetohoru bližu mjestu ablacije i kinetohora kao odgovor na ablaciju (gore: spojeni zeleni i ljubičasti kanal, dolje: shema). Skala prikazuje 1  $\mu\text{m}$ .

### **3.2. Povezanost premošćujućih mikrotubula sa sestrinskim kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama**

Konfokalnom mikroskopijom premošćujući mikrotubuli su vizualizirani u neposrednoj blizini sestrinskih kinetohornih vlakana i sestrinskih kinetohora, međutim potrebna je daljnja provjera njihovih interakcija kako bi ih se moglo distancirati od poznatih ne-kinetohornih, odnosno interpolarnih mikrotubula. U slučaju postojanja poveznica između premošćujućih mikrotubula i sestrinskih kinetohora i kinetohornih vlakana pretpostavljeno je zajedničko gibanje navedenih struktura prilikom otpuštanja sila generiranih u jedinici diobenog vretena nakon ablacije jednog sestrinskog kinetohornog vlakna. Ablacijom, odnosno laserskim zarezivanjem jednog kinetohornog vlakna iz jedinice diobenog vretena ispitala bi se i sile koje postoje u sustavu prije uvođenja perturbacije u sustav.

Kako bi se provjerila hipoteza postojanja premošćujućih mikrotubula koji su povezani sa sestrinskim kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama razvijen je protokol laserske ablacije sličan prijašnjim istraživanjima ablacije mikrotubula za identifikaciju sila minus krajeva mikrotubula diobenog vretena (Elting i sur., 2014). Korištenjem dvofotonskog lasera za ablaciju krajnjih kinetohornih vlakana analizirano je odgovarajuće kretanje kinetohornih vlakana i kinetohora. Kao rezultat ablacije dobiveno je zajedničko kretanje premošćujućeg vlakna, intaktnog, odnosno ne-ablatiranog kinetohornog vlakna, dijela ablatiranog kinetohornog vlakna vezanog na kinetohoru bližu mjestu ablacije i kinetohora (Slika 2C). Rezultatima ablacije kinetohornih vlakana potvrđuje se povezanost premošćujućeg vlakna s kinetohornim vlaknima i kinetohorama u jedinstveni element (Kajtez, 2014).

Povezanost premošćujućih mikrotubula sa sestrinskim kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama vizualizirana je i protokolom laserske ablacije potvrđena u stanicama HeLa. Međutim, potrebno je bilo ispitati postojanje i u drugim stanicama sisavaca. Napravljena je stanična linija epitela bubrega vrste *Potorous tridactylus* (PtK1) koja eksprimira obilježene kinetohorne proteine; centromerni protein A obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (GFP-CENP-A) ili protein visoke ekspresije u tumorima obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (GFP-Hec1). U staničnu liniju sa stabilnom ekspresijom navedenih proteina ubrizgan je tubulin obilježen X-rodaminom (X-rodamin-tubulin) (Slika 3A). Konfokalnom mikroskopijom su kao i u stanicama HeLa vizualizirana premošćujuća vlakna između sestrinskih kinetohora (Slika 3B). Premošćujuće vlakno, intaktno odnosno ne-ablatirano kinetohorno vlakno, dio ablatiranog kinetohornog vlakna koje je vezano na kinetohoru bližu mjestu ablacije i kinetohore, zajedno su se kretali u smjeru suprotnom od centra diobenog vretena nakon ponovljenog protokola laserske ablacije na krajnjoj jedinici diobenog vretena (Slika 3C) (Rüdiger, 2014).



**Slika 3. Povezanost premošćujućih mikrotubula sa sestrinskim kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama u metafaznoj stanici PtK1** (Preuzeto iz Vukušić, 2015).

- (A) Diobeno vreteno kompletne stanice PtK1 s ekspresijom GFP-Hec1 (ljubičasto) i ubrizganim X-rodamin-tubulin (zeleno). Kinetohorni i ne-kinetohorni mikrotubuli diobenog vretena obojeni su zeleno, a kinetohore ljubičasto. Skala prikazuje 1  $\mu\text{m}$ .
- (B) Diobeno vreteno dijela stanice PtK1 s ekspresijom GFP-Hec1 (ljubičasto) i ubrizganim X-rodamin-tubulin (zeleno). Fokus je na krajnjoj jedinici diobenog vretena. Premošćujuće vlakno je vidljivo ispod krajnjeg para kinetohora (gore: spojeni zeleni i ljubičasti kanal, sredina: samo zeleni kanal, dolje: shema). Skala prikazuje 1  $\mu\text{m}$ .

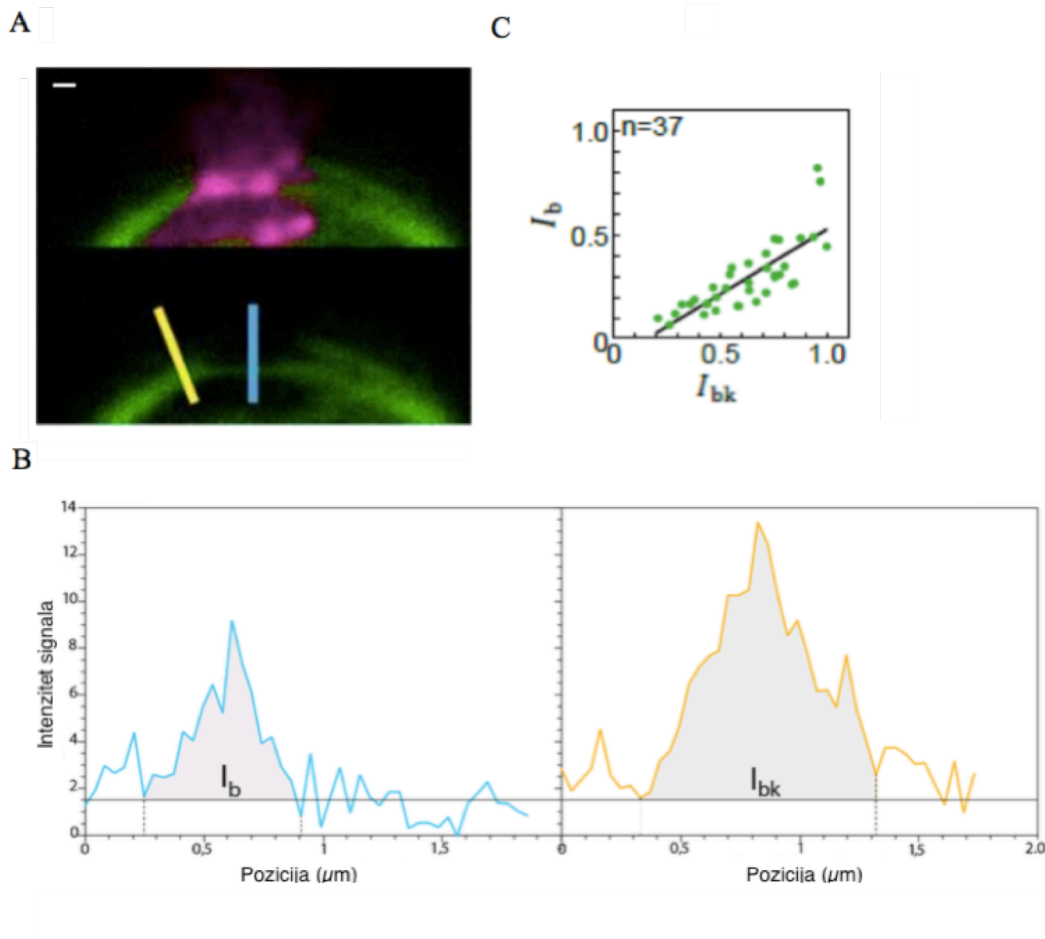
(C) Zajedničko kretanje premošćujućeg vlakna, intaktnog odnosno ne-ablatiranog kinetohornog vlakna, dijela ablatiranog kinetohornog vlakna vezanog na kinetohoru bližu mjestu ablacije i kinetohora kao odgovor na ablaciju (lijevo: spojeni zeleni i ljubičasti kanal, desno: shema). Skala prikazuje 1  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. Determinacija broja mikrotubula u premošćujućem vlaknu

Serijskim sekcijama kroz mitotsko diobeno vreteno pomoću elektronskih mikrografa determiniran je broj mikrotubula koji konvergiraju i ostvaruju kontakt s kinetohorama u stanicama HeLa. Pomoću dobivenih rezultata procijenjeno je da se kinetohorno vlakno u metafazi sastoji od  $17.1 \pm 0.6$  mikrotubula ( $n=24$ ) (Wendell i sur., 1993). Zbog granica razlučivosti svjetlosnog mikroskopa od približno 200 nm nije moguće vizualizirati i time determinirati pojedinačne mikrotubule u premošćujućem vlaknu. Za determinaciju relativnog broja mikrotubula u premošćujućem vlaknu korišten je intenzitet signala premošćujućeg vlakna i intenzitet signala kinetohornog vlakna zajedno s premošćujućim. Intenzitet signala premošćujućeg vlakna mjeri se između kinetohora,  $I_b$ , a intenzitet signala kinetohornog vlakna i premošćujućeg vlakna,  $I_{bk}$ , lateralno od kinetohora (Slika 4A). Iako postoji razlika između debljina intenziteta signala između mjerenih kinetohornih vlakana, kao i premošćujućih vlakana, dobiveni omjeri profila intenziteta signala,  $I_b/I_{bk}$  su konstantni i za stanice HeLa iznose  $45 \pm 2\%$  ( $n=37$ ) (Slika 4B, 4C) (Vukušić, 2015). Iz relativnih omjera intenziteta i rezultata istraživanja broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu određen je broj mikrotubula u premošćujućem vlaknu kao  $82 \pm 7\%$  broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu što sugerira da se premošćujuće vlakno u stanicama HeLa sastoji od  $14 \pm 2$  mikrotubula (Vukušić, 2015).

Kao u stanicama HeLa, serijskim sekcijama pomoću elektronskih mikrografa, dobiven je relativan broj mikrotubula i u kinetohornom vlaknu stanica PtK1. Kako se kinetohorna vlakna stanica PtK1 u metafazi sastoje od  $24.3 \pm 4.9$  mikrotubula ( $n=62$ ) (McEwen i sur., 1997), mjerenjem intenziteta signala premošćujućeg vlakna i intenziteta signala premošćujućeg i kinetohornog vlakna, dobiven je omjer  $I_b/I_{bk}$  od  $20 \pm 2\%$  što

sugerira da se premošćujuće vlakno u stanicama PtK1 sastoji od  $6 \pm 1$  mikrotubula (Vukušić, 2015). Ovakav način determinacije broja mikrotubula koji se nalaze u premošćujućem vlaknu pokazao se ispravnim budući da je u prijašnjim istraživanjima u stanicama PtK1 određeno 3-8 mikrotubula koji se lateralno povezuju s kinetohorom (Dong i sur., 2007).



**Slika 4. Mjerenje intenziteta signala premošćujućeg vlakna i snopa koji se sastoji od kinetohornog i premošćujućeg vlakna u metafaznoj stanici HeLa (Preuzeto iz Vukušić, 2015).**

- (A) Pozicije mjerenja intenziteta signala proteina GFP-tubulin premošćujućeg vlakna (duž plave trake),  $I_b$  i snopa koji se sastoji od kinetohornog i premošćujućeg vlakna (duž žute trake),  $I_{bk}$  u stanicama HeLa. Kinetohorni i ne-kinetohorni mikrotubuli diobenog vretena obojeni su zeleno, a kinetohore ljubičasto.

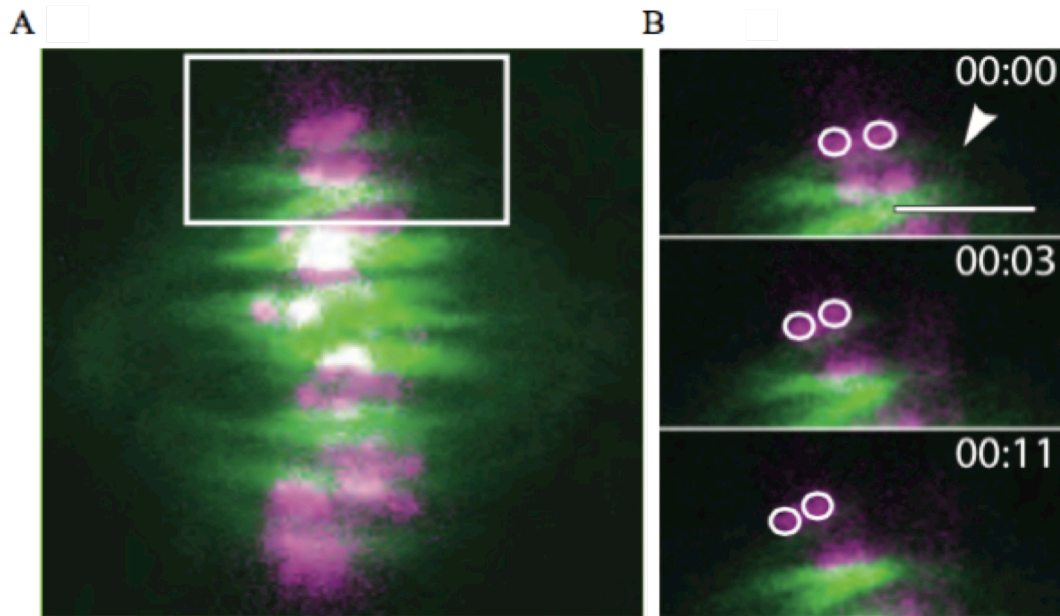
- (B) Grafovi intenziteta signala proteina GFP-tubulin koji odgovaraju mjerenju na poziciji premošćujućeg vlakna (lijevo, plavi graf) i snopa koji se sastoji od kinetohornog i premošćujućeg vlakna (desno, žuti graf). Vertikalne linije prikazuju granice područja mjerenja intenziteta signala, horizontalne linije ograničavaju pozadinski signal.
- (C) Intenzitet signala premošćujućeg mikrotubula kao funkcija intenziteta signala kinetohornog vlakna i premošćujućeg vlakna zajedno.

### 3.4. Antiparalelnost premošćujućeg vlakna

Interpolarni, ne-kinetohorni mikrotubuli polaze sa polova diobenog vretena i preklapaju se u središnjem dijelu tijekom mitoze kako bi osigurali bipolarnost diobenog vretena. Suprotno ne-kinetohornim, kinetohorni mikrotubuli od kojih se sastoji kinetohorno vlakno su orijentirani paralelno. Kako bi se istražila orijentacija premošćujućih mikrotubula, sastoji li se premošćujuće vlakno, kao vrsta ne-kinetohornih mikrotubula od antiparalelnih regija, upotrebljen je protein regulator citokineze 1 (PRC1). PRC1 je autonoman, visoko konzerviran član obitelji Ase1p ne-motornih proteina povezan s mikrotubulima koji se veže na preklapajuće dijelove antiparalelnih mikrotubula što je uočeno na interpolarnim mikrotubulima (Bieling, 2010). Napravljena je stanična linija HeLa s ekspresijom proteina PRC1 koji je obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (GFP-PRC1) i ekspresijom centromernog proteina B koji je obilježen monomernim crvenim fluorescentnim proteinom (mRFP-CENP-B) (Slika 5A).

U skladu s ostalim istraživanjima signal proteina PRC1 je lokaliziran u središtu diobenog vretena, međutim asocijacija proteina PRC1 na mjestima gdje su vizualizirani premošćujući mikrotubuli u stanicama koje ne ekspimiraju PRC1, dakle u neposrednoj blizini sestrinskih kinetohora, indicirala je prisutnost antiparalelnih mikrotubula u premošćujućem vlaknu. Nakon laserske ablacije kinetohornog vlakna krajnje jedinice diobenog vretena, PRC1 signal zajedno s intaktnim odnosno ne-ablatiranim kinetohornim vlaknom, dijelom ablatiranog kinetohornog vlakna koje je vezano na kinetohoru bližu

mjestu ablacije i kinetohore, kretali su se prema van, suprotno od središta diobenog vretena (Slika 5B). Uočeno zajedničko kretanje struktura prikazuje kako signal proteina PRC1 u blizini kinetohora odgovara antiparalelnoj regiji preklapajućih mikrotubula u premošćujućem vlaknu (Solomatina, 2014).



**Slika 5. Lokaliziranost proteina PRC1 u premošćujućem vlaknu metafazne stanice HeLa** (Preuzeto iz Solomatina, 2014).

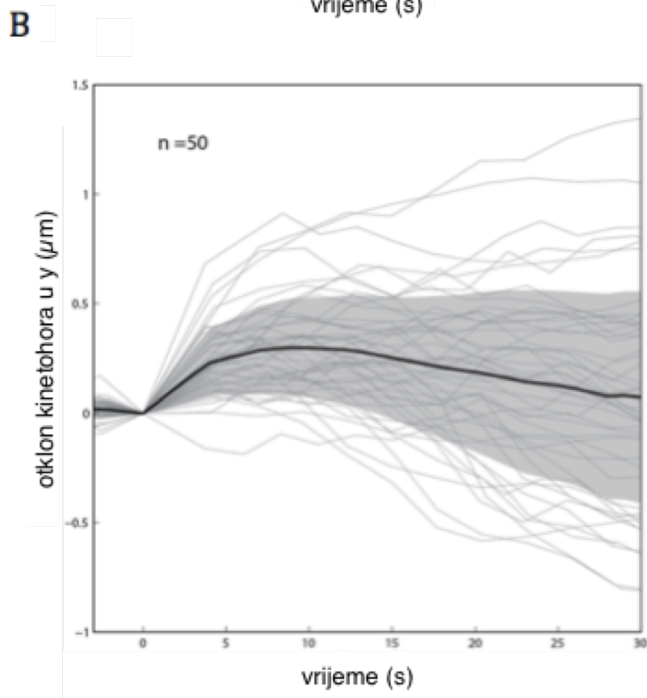
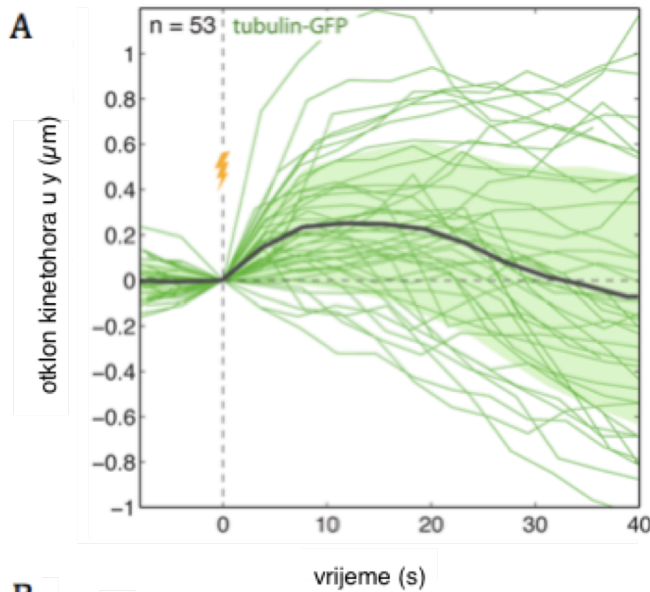
- (A) Diobeno vreteno kompletne stanice HeLa s ekspresijom GFP-PRC1 (zeleno) i mRFP-CENP-B (ljubičasto). Antiparalelne regije preklapanja mikrotubula diobenog vretena obojene su zeleno, a kinetohore ljubičasto.
- (B) Kretanje signala proteina PRC1 zajedno s intaktnim odnosno ne-ablatiranim kinetohornim vlaknom, dijelom ablatiranog kinetohornog vlakna koje je vezano na kinetohoru bližu mjestu ablacije i kinetohora prema van, suprotno od središta diobenog vretena. Skala prikazuje 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.5. Aproximacija oblika silama kompresije i tenzije

Premošćujuće vlakno vizualizirano je u staničnim linijama HeLa i PtK1, distancirano od interpolarnih mikrotubula, te mu je determiniran broj i određeno svojstvo antiparalelnosti. Sama vizualizacija mitotskog diobenog vretena ne daje dovoljno informacija o prisutnosti sila na pojedine elemente zbog kontinuiranog uravnotežavanja strukture. Za bolje razumijevanje distribucije sila i održavanja strukturnog integriteta pomoću sila potrebno je bolje ispitati postojanje sila aproksimacijom oblika i proučavanjem odgovora na lasersku perturbaciju u metafazi.

Pretpostavka je da je snop mikrotubula elastični element, štap (Kajtez, 2014; Rüdiger, 2014; Solomatina, 2014). Izmjerena duljina kinetohornih vlakana krajnje jedinice diobenog vretena iznosi  $14.1 \pm 1.3 \mu\text{m}$ , dok je udaljenost između centrosoma  $10.7 \pm 1.0 \mu\text{m}$  ( $n=30$ ) (Kajtez, 2014). Veća duljina kinetohornih vlakana od udaljenosti između centrosoma upućuje na prisutnost sila kompresije na mikrotubule na mjestima centrosoma. Mikrotubuli su elastični elementi koji pohranjuju elastičnu potencijalnu energiju pri kompresiji zbog čega se savijaju. Protokolom laserske ablacije pohranjena energija se oslobađa i konvertira u kinetičku energiju u procesu izravnavanja. Vizualizacija krajnje jedinice diobenog vretena nakon ablacije prikazuje izravnavanje ablatiranog dijela kinetohornog vlakna i intaktnog kinetohornog vlakna. Sile kompresije na polovima diobenog vretena analizirane su praćenjem sestrinskih kinetohora u vremenu nakon ablacije (Slika 6). Dobiveni rezultati pokazuju otklon jedinice diobenog vretena suprotno od središta diobenog vretena, odnosno duge osi diobenog vretena kao posljedicu oslobađanja pohranjene energije.





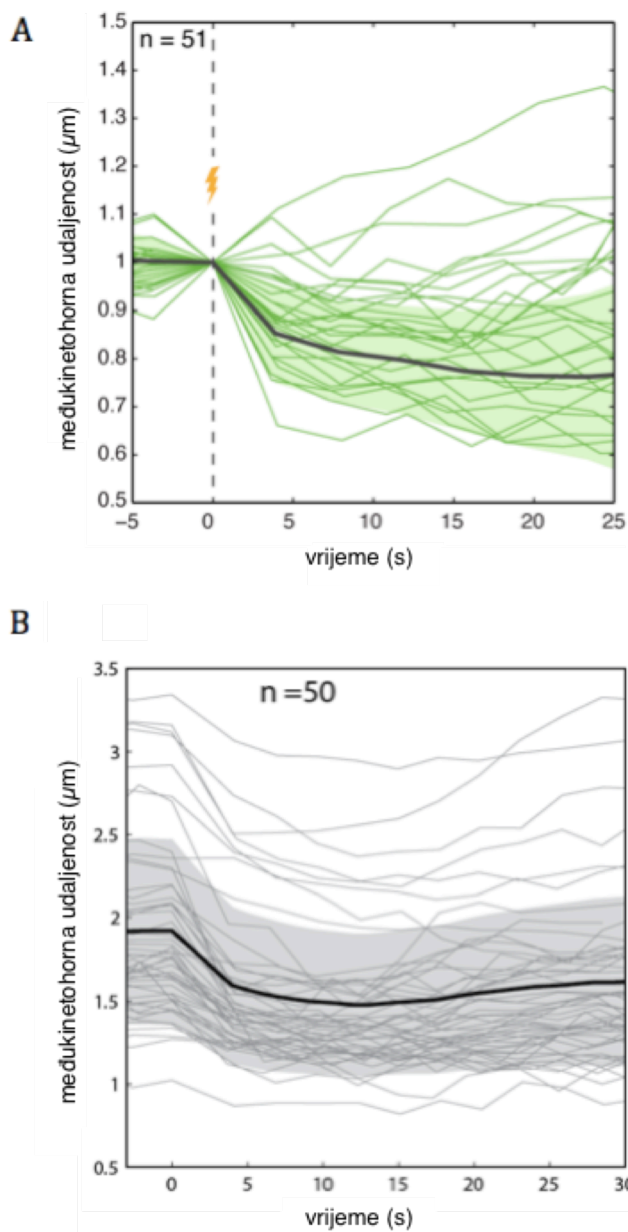
**Slika 6. Otklon sestrinskih kinetohora suprotno od središta diobenog vretena nakon laserske ablacije.**

**(A)** Otklon sestrinske kinetohore bliže mjestu ablacije u smjeru suprotnom od središta diobenog vretena na y-osi u stanicama HeLa s obzirom na poziciju prije ablacije. Pri 0 s izvršena je ablacija. Pojedinačne stanice, srednja vrijednost i standardna devijacija prikazani su zelenim linijama, crnom linijom i zelenim područjem (Preuzeto iz Kajtez, 2014).

**(B)** Otklon kinetohore bliže mjestu ablacije u smjeru suprotnom od središta diobenog vretena na y-osi u stanicama PtK1 s obzirom na poziciju prije ablacije. Pri 0 s izvršena je ablacija. Pojedinačne stanice, srednja vrijednost i standardna devijacija prikazani su sivim linijama, crnom linijom i sivim područjem (Preuzeto iz Vukušić, 2015).

Centromerna regija je rastegnuta u metafazi što pretpostavlja sile u smjeru prema polovima zbog čega su sestrinske kinetohore pod tenzijom. Kao što se praćenjem odgovora kinetohornih vlakana na uvođenje perturbacije u sustav prati prisutnost

kompresivne sile izravnavanjem, promjena duljine između sestrinskih kinetohora govori o silama u toj regiji diobenog vretena. Pozicija sestrinskih kinetohora krajnje jedinice diobenog vretena praćena je u vremenu kao odgovor na lasersku ablaciju. Praćenjem sestrinskih kinetohora i analizom podataka uočeno je smanjenje udaljenosti između kinetohora (Kajtez, 2014; Rüdiger, 2014; Solomatina, 2014). Kromosomi između kinetohora se ponašaju kao elastična opruga zbog čega smanjenjem tenzije, koja je bila uzrokovana vezanjem kinetohora na kinetohorna vlakna, dolazi do relaksacije i smanjenja udaljenosti između kinetohora (Slika 7).



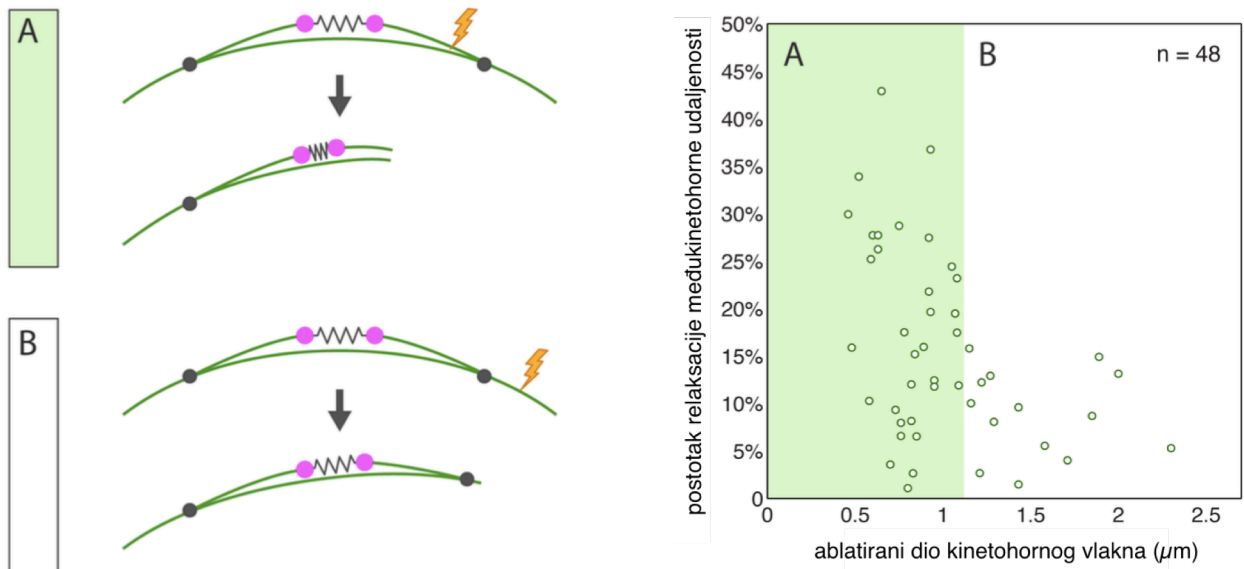
**Slika 7. Smanjenje udaljenosti između sestrinskih kinetohora nakon laserske ablacije.**

**(A)** Smanjenje međukinetohorne udaljenosti u stanicama HeLa s obzirom na poziciju prije ablacije. Pri 0 s izvršena je ablacija. Pojedinačne stanice, srednja vrijednost i standardna devijacija prikazani su zelenim linijama, crnom linijom i zelenim područjem (Preuzeto iz Kajtez, 2014)

**(B)** Smanjenje međukinetohorne udaljenosti u stanicama PtK1 s obzirom na poziciju prije ablacije. Pri 0 s izvršena je ablacija. Pojedinačne stanice, srednja vrijednost i standardna devijacija prikazani su sivim linijama, crnom linijom i sivim područjem (Preuzeto iz Vukušić, 2015).

### 3.6. Točka spajanja premošćujućih mikrotubula i kinetohornog vlakna

Prisutnost premošćujućeg vlakna objašnjava izravnavanje nakon laserske ablacije. Preko lateralnih poveznica s oba sestrinska kinetohorna vlakna, premošćujuće vlakno integrira jedinicu diobenog vretena u jedinstveni elastični sustav. Iz tog razloga jedinica diobenog vretena ima naklonost izravnavanju komponenata nakon što je poveznica s jednim centrosomom izgubljena. Također, lateralna mjesta spajanja premošćujućeg vlakna s kinetohornim vlaknima trebala bi biti prije završetka kinetohornih vlakana u centrosomima. Iako mjesta spajanja nisu vidljiva konfokalnom mikroskopijom, različit odgovor na lasersku ablaciju može dati približne rezultate parametara. U slučaju ablacije kinetohornog vlakna između mjesta spajanja premošćujućih mikrotubula i kinetohornog vlakna i centrosoma, premošćujuće vlakno i kinetohorno vlakno bi trebali ostati povezani. U slučaju ablacije kinetohornog vlakna između kinetohore i mjesta spajanja premošćujućih mikrotubula i kinetohornog vlakna njihova poveznica se gubi (Slika 8A). Pretpostavljeno je da se gubitkom poveznice značajno smanjuje tenzija u centromernoj regiji i sestrinske kinetohore se znatno približe, znatno se smanji međukinetohorna udaljenost. Analiziranjem odgovora jedinice diobenog vretena na lasersku ablaciju na različitim udaljenostima od same kinetohore određena je točka spajanja premošćujućih mikrotubula i kinetohornog vlakna na udaljenosti približno 1.1  $\mu\text{m}$  od kinetohore (Slika 8B) (Kajtez, 2014). Rezultat sugerira uključenost premošćujućeg vlakna u uravnotežavanje sila na kinetohorama i u održavanje strukturnog integriteta diobenog vretena.



**Slika 8. Točka spajanja premošujućih mikrotubula i kinetohornog vlakna** (Preuzeto iz Kajtez, 2014).

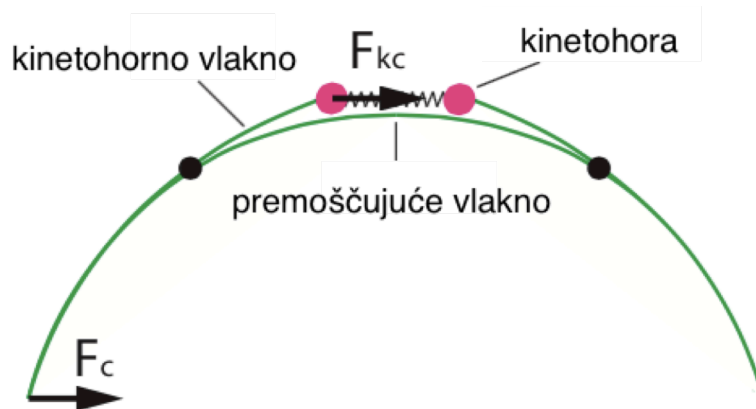
Lijevo - Ilustracije dva odgovora ovisna o mjestu ablacije kinetohornog vlakna; ablacija između točke spajanja i kinetohore (A) i ablacija između točke spajanja i centrosoma (B). Desno - Ovisnost postotka relaksacije centromerne regije, odnosno udaljenosti između kinetohora o duljini ablatiranog dijela kinetohornog vlakna. Zelena regija prikazuje slučaj u kojem je duljina ablatiranog dijela kinetohornog vlakna manja (A), a bijela regija veća od 1.1  $\mu\text{m}$  (B).

### 3.7. Fizikalni model

Izdvajanjem molekularnih interakcija, diobeno vreteno može se proučavati biofizikalnim ispitivanjem svojstava struktura unutar diobenog vretena. Za bolje shvaćanje uloge premošujućeg vlakna kao poveznice između kinetohornih vlakana u pozicioniranju sestrinskih kinetohora potreban je teorijski model u kojem povećanje debljine snopova mikrotubula povećava rigidnost elastičnog elementa. Provjeravanjem parametarskog prostora različitim setovima analiziranih eksperimentalnih parametara stvoren je teorijski

model diobenog vretena u metafazi (Slika 9). Teorijski model, s pretpostavkom da su snopovi mikrotubula elastični štapovi s malim aproksimacijama kuteva, opisuje premošćujuće vlakno lateralno povezano s kinetohornim vlaknom na točno određenoj točki spajanja, sestrinske kinetohore međusobno povezane centromernim regijama kao elastičnom oprugom i jedan kraj kinetohornog vlakna fiksiran u centrosomu, a drugi kraj slobodno povezan s kinetohorom.

Teorijski model implicira da diobeno vreteno, zajedno s premošćujućim vlaknom, ima sposobnost stvaranja zakrivljenog oblika diobenog vretena i održavanja kromosoma u metafaznoj ploči u prisutnosti dvije osnovne sile, tenzije i kompresije u diobenom vretenu. Teorijski model predviđa tri svojstva; konveksni oblik diobenog vretena, poziciju sestrinskih kinetohora krajnje jedinice diobenog vretena iznad odgovarajućeg premošćujućeg vlakna i povećanje otklona krajnje jedinice diobenog vretena prilikom ablacije kao posljedica povećanja debljine premošćujućeg vlakna, odnosno povećanja sila kompresije na jedinicu diobenog vretena. U modelu, tenzija na kinetohorama rezultira tenzijom na cijelom segmentu kinetohornog vlakna između kinetohore i točke spajanja. Tenzija kao i kompresija na polovima diobenog vretena uravnotežene su postojanjem premošćujućeg vlakna. Premošćujuće vlakno time dozvoljava postojanje tenzije i kompresije unutar iste jedinice diobenog vretena (Kajtez, 2014; Rüdiger, 2014; Solomatina, 2014).



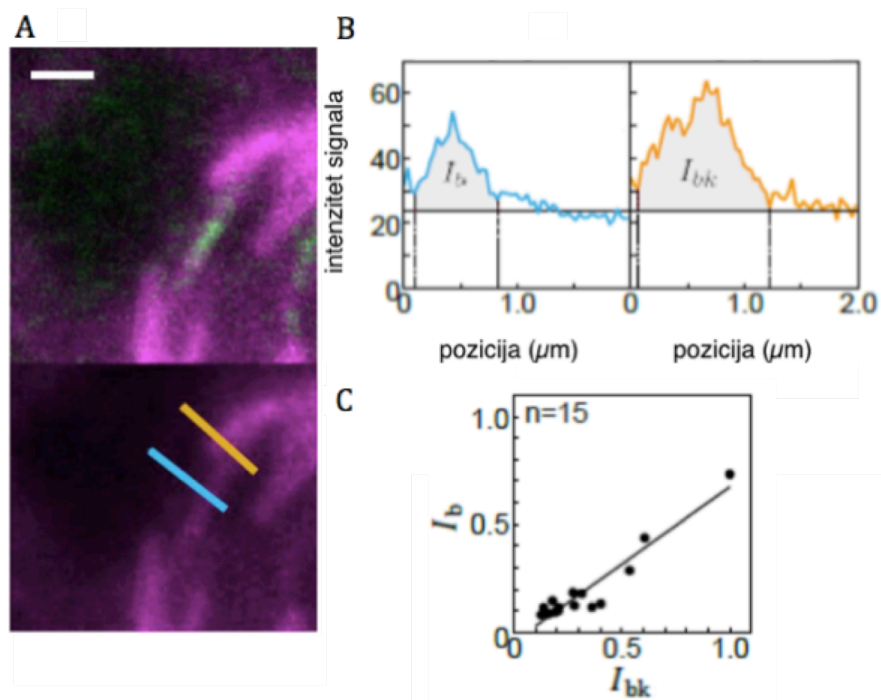
**Slika 9. Shema teorijskog modela metafaznog diobenog vretena** (Preuzeto iz Solomatina, 2014). Polovica diobenog vretena se sastoji od tri elastična štapa, a kromosomi kao elastična opruga predstavljaju poveznicu između sestrinskih kinetohora. Prvi štap proizlazi iz fiksirane pozicije, centrosoma na koji djeluje sila kompresije,  $F_c$ , a završava u točki spajanja (crna točka) gdje se razgranjuje u kinetohorno i premošćujuće vlakno. Drugi proizlazi iz točke spajanja i povezuje se na kinetohoru gdje se generira sila tenzije,  $F_{kc}$ . Treći proizlazi iz točke spajanja i završava u središnjem dijelu jedinice diobenog vretena. Centralni dio premošćujućeg vlakna je pod silom kompresije koja je zbroj kompresije koja djeluje na centrosom i tenzije koja djeluje na kinetohoru.

### **3.8. Povećanje sile na polovima diobenog vretena povećanjem debljine premošćujućeg vlakna**

Rješenje teorijskog modela za različit broj mikrotubula unutar premošćujućeg vlakna implicira da je za element veće rigidnosti savijanja potrebna veća sila, odnosno da je kod debljeg premošćujućeg vlakna pohranjena veća sila na polovima diobenog vretena. Kako bi se potvrdila pretpostavka osmišljenog fizikalnog modela potrebno je bilo konstruirati deblje premošćujuće vlakno. Prema saznanjima o tome koji se proteini nalaze u

premošćujućem vlaknu prekomjerna razina ekspresije tubulina ili proteina PRC1 ne bi utjecala na svojstva premošćujućeg vlakna budući da ne bi bilo slobodnih mikrotubula da se povezuju u premošćujuće vlakno ili ne bi bilo proteina koji će antiparalelne mikrotubule međusobno povezivati u antiparalelno vlakno. Jedino u slučaju prekomjerne ekspresije oba proteina, PRC1 i tubulina, premošćujuće vlakno može postati deblje. U tu svrhu u staničnoj liniji HeLa s ekspresijom mRFP-CENP-B i prekomjernom ekspresijom GFP-PRC1 potaknuta je prekomjerna ekspresija mCherry-tubulina (Solomatina, 2014).

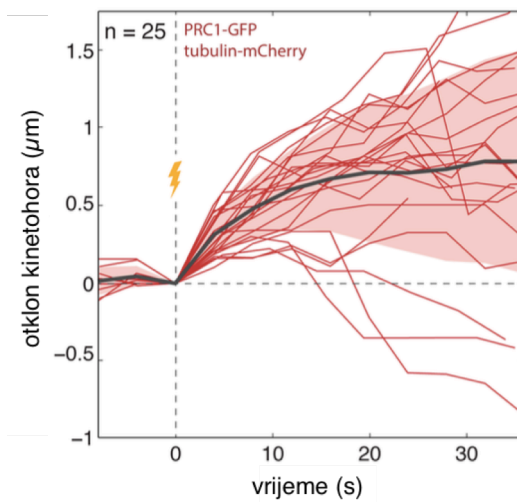
Za provjeru debljine premošćujućeg vlakna konstruirane linije, korišten je protokol za determinaciju relativnog broja mikrotubula u premošćujućem vlaknu stanica HeLa i PtK1 mjerenjem intenziteta signala premošćujućeg vlakna i intenzitet signala kinetohornog vlakna zajedno s premošćujućim. Dobiveni omjeri profila intenziteta signala za staničnu liniju s prekomjernom ekspresijom GFP-PRC1 i mCherry-tubulina,  $I_b/I_{bk}$  su konstantni i iznose  $60 \pm 2\%$  ( $n=15$ ), što sugerira da se premošćujuće vlakno u toj staničnoj liniji sastoji od  $23 \pm 5$  mikrotubula (Slika 10) (Vukušić, 2015). Protokolom laserske ablacije provjerena je točnost modela koji pretpostavlja da metafazno diobeno vreteno s debljim premošćujućim vlaknom ima veće sile kompresije na polovima što vodi bržem izravanjanju i otklonu jedinice diobenog vretena od duge osi diobenog vretena, odnosno središta diobenog vretena (Slika 11). Dobiveni rezultati su uspoređeni s rezultatima brzine otklona sestrinskih kinetohora suprotno od središta diobenog vretena nakon laserske ablacije u staničnoj liniji s normalnom ekspresijom GFP-tubulin i mRFP-CENP-B (Slika 6). Stanična linija s tanjim premošćujućim vlaknom imala je srednju brzinu otklona približno 40 nm/s ( $n=23$ ). S druge strane, srednja brzina otklona stanične linije s debljim premošćujućim vlaknom je bila znatno veća i iznosila približno 70 nm/s ( $n=23$ ). Usporedba rezultata potvrđuje pretpostavku fizikalnog modela da deblje premošćujuće vlakno distribuirano snažniji odgovor na lasersku ablaciju otpuštanjem veće količine pohranjene elastične potencijalne energije izravanjanjem. Potvrđuje se pretpostavka da premošćujuće vlakno, lateralno povezano sa sestrinskim kinetohornim vlaknima, integrira diobeno vreteno u jedinstveni elastični sustav.



**Slika 10. Mjerenje intenziteta signala premošćujućeg vlakna i snopa koji se sastoji od kinetohornog i premošćujućeg vlakna u metafaznoj stanici HeLa s prekomjernom ekspresijom GFP-PRC1 i mCherry-tubulina (Preuzeto iz Vukušić, 2015).**

- (A) Pozicije mjerenja intenziteta signala mCherry-tubulin premošćujućeg vlakna (duž plave trake),  $I_b$  i snopa koji se sastoji od kinetohornog i premošćujućeg vlakna (duž žute trake),  $I_{bk}$ . Antiparalelne regije preklapanja mikrotubula diobenog vretena obojene su zeleno, a kinetohorni i ne-kinetohorni mikrotubuli ljubičasto.
- (B) Grafovi intenziteta signala mCherry-tubulin koji odgovaraju mjerenju na poziciji premošćujućeg vlakna (lijevo, plavi graf) i snopa koji se sastoji od kinetohornog i premošćujućeg vlakna (desno, žuti graf). Vertikalne linije prikazuju granice područja mjerenja intenziteta signala, horizontalne linije ograničavaju pozadinski signal.
- (C) Intenzitet signala premošćujućeg mikrotubula kao funkcija intenziteta signala kinetohornog vlakna i premošćujućeg vlakna zajedno.





**Slika 11. Povećanje sile na polovima diobenog vretena povećanjem debljine premošćujućeg vlakna** (Preuzeto iz Kajtez, 2014). Otklon sestrinske kinetohore bliže mjestu ablacije u smjeru suprotnom od središta diobenog vretena na y-osi u stanicama HeLa s ekspresijom GFP-PRC1, mCherry-tubulina i mRFP-CENP-B s obzirom na poziciju prije ablacije. Pri 0 s izvršena je ablacija. Pojedinačne stanice, srednja vrijednost i standardna devijacija prikazani su crvenim linijama, crnom linijom i crvenim područjem.

#### 4. Rasprava

Osnovne molekularne komponente i dinamika mitotskog diobenog vretena su upotrebom novih molekularnih metoda sve bolje shvaćeni. Međutim, iako su molekularna arhitektura i elementarni mehanizmi stvaranja sila poznati, malo se zna o mehanizmima i načelima koji reguliraju konstrukciju i funkciju diobenog vretena. Poteškoće nastaju prilikom razumijevanja integracije molekularnih mehanizama s poznate mikroskopske razine na

ukupni mezoskopski mehanički model diobenog vretena. Biofizička istraživanja diobenog vretena kao mehaničke strukture koja je visoko dinamična, a uspijeva održati sile uravnoteženima, mogu nadići ograničenja molekularnog pristupa. Metafaza, stadij u kojem su sestrinske kromatide uravnotežene u središtu diobenog vretena, polazna je točka za istraživanje biofizike diobenog vretena budući da se u tom stadiju diobeno vreteno nalazi u stabilnom ustaljenom stanju. Sile prisutne u diobenom vretenu su ključne za ugradnju kromosoma u samo vreteno i segregaciju sestrinskih kromatida u anafazi.

Budući da se sile ne mogu direktno izmjeriti, razvijenim protokolima uvođenja fizikalnih perturbacija u sustav analizira se odgovor sustava kao posljedica djelovanja određenih sila. Analize rezultata eksperimenata s laserskom ablacijom sestrinskog kinetohornog vlakna u krajnjoj jedinici diobenog vretena koja se kao odgovor na perturbaciju giba suprotno od središta diobenog vretena i izravjava sugerira djelovanje sila kompresije na poziciji polova diobenog vretena (Slika 6) (Kajtez, 2014; Rüdiger, 2014; Solomatina, 2014). Prisutnost sila kompresije suglasna je s eksperimentima zarezivanja većeg broja kinetohornih vlakana snopom UV svjetlosti što je rezultiralo skraćivanjem oštećene polovice diobenog vretena (Pickett-Heaps, 1997). S druge strane, tenzija u centromernoj regiji koja djeluje na sestrinske kinetohore je kontrolna točka za ispravnu distribuciju repliciranog genoma tijekom stanične diobe (Hoyt i sur., 1991; Li i Murray, 1991; Mussacchio i Salmon, 1991). Prisutnost sila tenzije na centromernu regiju koju generiraju kinetohore vučnim silama kao posljedicom depolimerizacije mikrotubula i aktivnosti motornih proteina (Dumont, 2011) potvrđena je i smanjenjem udaljenosti između sestrinskih kinetohora nakon laserske ablacije krajnje jedinice diobenog vretena (Slika 7) (Kajtez, 2014; Rüdiger, 2014; Solomatina, 2014).

Kako bi kinetohorno vlakno moglo biti pod utjecajem sila tenzije na jednom kraju, a pod silama kompresije na drugom kraju što sugerira postojanje tenzije i kompresije u jedinstvenom elementu diobenog vretena, nedostaje nepoznati element koji stvara interakcije s kinetohornim vlaknom kako bi se uravnotežile sile u metafaznom diobenom vretenu (Dumont i Mitchison, 2009). Zanimljivo, ne-kinetohorni mikrotubuli uočeni su elektronskom mikroskopijom u regiji između sestrinskih kinetohora endosperma biljaka (Jensen, 1982), jajašaca *Xenopus* (Ohi i sur., 2003) i stanica PtK1 (McDonald i sur., 1992). Snop preklapajućih mikrotubula koji je lateralno povezan s

kinetohornim vlaknima i koji djeluje kao most između sestrinskih kinetohora nazvan je premošćujuće vlakno, a mikrotubuli od kojih je sastavljen premošćujući mikrotubuli (Kajtez, 2014; Rüdiger, 2014; Solomatina, 2014).

Pomoću eksperimenata laserske ablacije, pri kojima se premošćujuće vlakno kretalo zajedno s ostatkom jedinice diobenog vretena, premošćujuće vlakno je distancirano od interpolarnih mikrotubula koji također stvaraju antiparalelne nizove u središnjem dijelu diobenog vretena. Ustanovljena je čvrsta lateralna povezanost nove vrste mikrotubula sa sestrinskim kinetohornim vlaknima i kinetohorama u jedinstvenu mehaničku struktura koja je sposobna izdržati značajne fizikalne perturbacije. Takav jedinstven element ima snažnije poveznice između premošćujućeg vlakna i sestrinskih kinetohornih vlakana nego između susjednih kinetohornih vlakana. Lokalizacija proteina PRC1 u središnjem dijelu jedinice diobenog vretena, odnosno u premošćujućem vlaknu, sugerira preklapajuće regije antiparalelnih mikrotubula (Slika 5) i time plus krajeve premošćujućih mikrotubula koji proizlaze iz jedne sestrinske kinetohore na mjesto ispod pozicije druge sestrinske kinetohore (Polak, 2015).

Postojanjem premošćujućeg mikrotubula nastala je potreba za promjenom klasičnog modela arhitekture diobenog vretena. Provjeravanjem parametarskog prostora različitim setovima analiziranih eksperimentalnih parametara konstruiran je fizikalni model diobenog vretena u metafazi koji uključuje premošćujuće vlakno (Slika 9). Fizikalni model je potvrdio da premošćujuće vlakno uravnotežavanjem sila održava konveksni oblik stanice uz prisutnost kompresije na centrosomima i tenzije na kinetohorama. Pretpostavka ovisnosti jačine sila na jedinicu diobenog vretena o debljini premošćujućeg vlakna potvrđena je konstruiranjem stanične linije HeLa s prekomjernom ekspresijom proteina PRC1 i tubulina koja je imala brži otklon od središta diobenog vretena prilikom eksperimenata laserske ablacije (Slika 11).

Premošćujuće vlakno je kao snop antiparalelnih mikrotubula, koji ostvaruju lateralne poveznice sa sestrinskim kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama u jedinstven element, dosadašnjim saznanjima zapravo element koji je nedostajao u karti distribucije sila unutar diobenog vretena stanice. Premošćujuće vlakno je time važan strukturni element u uravnotežavanju sila i očuvanju strukturnog integriteta diobenog vretena metafaze mitoze. Kako nova saznanja o postojanju premošćujućih mikrotubula

doprinosu boljem razumijevanju procesa stanične diobe bilo bi zanimljivo kao smjernicu za buduća istraživanja uzeti u obzir točku spajanja premošćujućeg vlakna s kinetohornim. Poznato je da kinetohore vezane na kinetohorne mikrotubule prolaze kroz usmjerenu nestabilnost u mitotskim animalnim stanicama, oscilirajući prema ili suprotno od polova diobenog vretena. Takvim oscilacijama koje nastaju promjenom duljine kinetohornih mikrotubula, a uzrokuju rastezanje centromera u metafazi, trebalo bi se provjeriti dolazi li do promjene smjera kretanja upravo na poziciji točke spajanja kinetohornog i premošćujućeg vlakna. Nadalje, konfokalnom mikroskopijom potrebno je snimiti kompletnu stanicu u metafazi, s minimalnim razmacima između slika pojedinih z-ravnina, kako bi se mogla konstruirati trodimenzionalna projekcija cijelog diobenog vretena. Analiza projekcija pomogla bi u karakterizaciji premošćujućih mikrotubula, njihovoj strukturi, poziciji unutar diobenog vretena i ovisnosti parametara diobenog vretena o svojstvima premošćujućeg vlakna. Također, potrebna je karakterizacija svih umrežavajućih i motornih proteina koji se nalaze u premošćujućem vlaknu, kao i detaljna analiza funkcija premošćujućeg vlakna u održavanju strukturnog integriteta u ostalim stadijima stanične diobe.

## 5. Literatura

1. Bieling, P., Telley, I.A., Surrey, T. (2010). A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell* 142, 420-432.
2. Cheerambathur, D.K., Desai, A. (2014). Linked in: formation and regulation of microtubule attachments during chromosome segregation. *Curr Opin Cell Biol* 26, 113-122.
3. Cheeseman, I.M., Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 33-46.
4. Dong, Y., Vanden Beldt, K.J., Meng, X., Khodjakov, A., McEwen, B.F. (2007). The outer plate in vertebrate kinetochores is a flexible network with multiple microtubule interactions. *Nat Cell Biol* 9, 516-522.
5. Dumont, S., Mitchison, T.J. (2009). Force and length in the mitotic spindle. *Curr Biol* 19, 749-761.
6. Dumont, S. (2011). Chromosome segregation: Spindle mechanics come to life. *Curr Biol* 21 (18), 688-690.

7. Elting, M.W., Hueschen, C.L., Udy, D.B., Dumont, S. (2014). Force on spindle microtubule minus ends moves chromosomes. *J Cell Biol* 206, 245-256.
8. Hoyt, M.A., Totis, L., Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.
9. Jensen, C.G. (1982). Dynamics of spindle microtubule organization: kinetochore fiber microtubules of plant endosperm. *J Cell Biol* 92, 540-558.
10. Kajtez, J. (2014). Study of forces in HeLa cell metaphase mitotic spindle using laser ablation, Master's thesis, Technische Universität Dresden Biotechnology Center (BIOTEC).
11. Li, R., Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-531.
12. McDonald, K.L., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., and McIntosh, J.R. (1992). Kinetochore microtubules in PTK cells. *J Cell Biol* 118, 369-383.
13. McEwen, B.F., Heagle, A.B., Cassels, G.O., Buttle, K.F., Rieder, C.L. (1997). Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J Cell Biol* 137, 1567-1580.
14. Musacchio, A., Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
15. Nezi, L., Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 21, 785-795.
16. Ohi, R., Coughlin, M.L., Lane, W.S., Mitchison, T.J. (2003). An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a KinI kinesin. *Dev Cell* 5, 309-321.
17. Pickett-Heaps, J.D., Forer, A., Spurck, T. (1997). Traction fibre: Toward a "tensegral" model of the spindle. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 37 (1), 1-6.
18. Polak, B. (2015). Analysis of metaphase spindle mechanics in HeLa cells by laser microsurgery. Master's Thesis, University of Zagreb, Faculty of Science, Department of Biology.
19. Rüdiger, J. (2014). Forces acting on kinetochores during metaphase in PtK1 cells. Master's Thesis, Technische Universität Dresden Biotechnology Center (BIOTEC).
20. Solomatina, A. (2014). Force Balance in the Mitotic Spindle of HeLa Cells Studied by High-Speed Live-Cell Imaging. Master's Thesis, Technische Universität Dresden Biotechnology Center (BIOTEC).
21. Vukušić, K. (2015). Organisation of microtubules and force-balance in metaphase spindles of HeLa and Ptk1 cells. Graduation Thesis, University of Zagreb, Faculty of Science, Department of Biology.
22. Wendell, K.L., Wilson, L., Jordan, M.A. (1993). Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. *J Cell Sci* 104 (Pt 2), 261-274.