

Ekspanzijska mikroskopija u proučavanju arhitekture diobenog vretena

Ponjavić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:502098>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Ponjavić

Ekspanzijska mikroskopija u proučavanju
arhitekture diobenog vretena

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za Biofiziku stanice na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Ive Tolić (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, 10000 Zagreb, Hrvatska) te suvodstvom prof. dr. sc. Mirjane Pavlice (Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvale

Za početak, najveća zahvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivi Tolić. Hvala na ukazanom povjerenju i prilici da učim i radim ono što volim. Hvala za motivaciju da uvijek dam najbolje od sebe. Njena strast prema znanosti te znanje i način na koji ga prenosi, vječna su mi inspiracija.

Hvala Juri, za sve što me naučio u proteklih godinu dana, a toga je puno. Hvala za ogromnu pomoć pri pisanju ovog rada i za uloženo vrijeme. Hvala na brojnim savjetima za ekspanzijsku u onim trenucima kada se činilo da više nema pomoći.

Hvala Kruni, koji je sa mnom proveo skoro svaki dan rada na ekspanzijskoj mikroskopiji. Hvala na svemu što me naučio i na vremenu koje je uložio da meni olakša rad u laboratoriju. Njegove bezbrojne ideje i rješenja, znanje te ljubav s kojom radi, nešto je čemu se divim od prvog dana.

Hvala svim ostalim članovima grupe Tolić koji su jedan od razloga zbog kojeg se svakodnevno veselim odlasku u lab. Hvala Renko, bez koje moj diplomski rad ne bi bio napravljen i bez koje se ne bih smijala toliko koliko jesam. Hvala Barbi, Steli, Mihaeli, Jeleni, Bruni i Patriku na svim savjetima i brojnim zanimljivim razgovorima. Hvala Sonji koja me naučila kako se održava red u labu. Hvala Ivani na modnim razgovorima, pomoći pri uređivanju slika te psihičkom ohrabrivanju kad god je to bilo potrebno.

Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Nenadu Pavinu i cijeloj Pavin grupi na znanstvenim savjetima te na prilici da biologiju promotrim očima fizičara.

Hvala prof. dr. sc. Mirjani Pavlici što je bila nastavnica ovog diplomskog rada.

Hvala mojim prijateljima koji su sa mnom proživljavali sve ove godine. Bez Vas danas ne bih bila tu gdje jesam i neizmjereno sam zahvalna što Vas imam.

Hvala Roku koji je svih pet godina slušao svako moje žaljenje pred ispit i slavio sa mnom svaki moj uspjeh.

Mojoj jednoj jedinoj Nikol, hvala što postojiš.

I najvažnije hvala, hvala mojim roditeljima, koji su mi omogućili sve što sam ikad trebala, a i željela. Vi ste moja najveća sreća i moja snaga. Nadam se da ću Vam se jednog dana moći odužiti.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspanzijska mikroskopija u proučavanju arhitekture diobenog vretena

Ivana Ponjavić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ekspanzijska mikroskopija je nova metoda mikroskopije u kojoj se kemijskim postupcima fizički povećava fiksirani uzorak te dozvoljava da strukture bliže od granice difrakcije svjetlosti (250 nm) postanu razlučive. To je tehnika u kojoj su fluorofori na fiksiranom uzorku vezani za polimer koji ima mogućnost izotropnog ekspaniranja te kada se polimer ekspanira, omogućava super-rezolucijsku mikroskopiju sa standardnim mikroskopom. Cilj ovog rada bio je uz pomoć razvijene metode ekspanzijske mikroskopije, proučiti arhitekturu diobenog vretena, molekularne strukture odgovorne za jednaku raspodjelu kromosoma među stanicama kćerima. Vizualizirane i analizirane su RPE1 i U2OS stanice. U ovom radu razvijen je protokol za ekspanzijsku mikroskopiju, te je dobivena slika cjelovitog diobenog vretena u ljudskim stanicama uz upotrebu ekspanzijske mikroskopije. Pokazano je da snimke ekspandiranih diobenih vretena nude mnoštvo informacija o arhitekturi vretena te je u budućnosti potrebno optimizirati protokol za bilo koji protein, koji se želi vizualizirati u diobenom vretenu.

(71 stranica, 30 slika, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: ekspanzijska mikroskopija, prenosni i kinetohorni mikrotubuli, mitoza.

Voditelj: dr. sc. Iva Tolić, prof.

Suvoditelj: dr. sc. Mirjana Pavlica, prof.

Ocjenitelji:

1. dr. sc. Mirjana Pavlica, prof.

2. dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

3. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, doc.

Zamjena: dr. sc. Branimir Bertoša, izv. prof.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

Expansion microscopy in exploring the architecture of the mitotic spindle

Ivana Ponjavić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Expansion microscopy is a newly discovered microscopy technique that uses physical expansion of fixed specimens to allow features closer than the diffraction limit of light (250 nm) to become resolvable in the expanded specimen. It is a technique in which fluorophores on fixed specimens are linked to a swellable polymer that is physically expanded to enable super-resolution microscopy with ordinary microscopes. The goal of this thesis was, with the help of the developed expansion microscopy technique, to study the architecture of the mitotic spindle, a molecular machine responsible for equal distribution of chromosomes between the daughter cells. RPE1 and U2OS cells were visualized and analyzed. In this thesis the protocol for expansion microscopy was developed and used for imaging the whole mitotic spindle in human cells. It was shown that the images of the expanded mitotic spindles offer plenty information about the architecture of the spindle and in the future it would be interesting to optimize the protocol for visualising any protein in the mitotic spindle with the expansion microscopy.

(71 pages, 30 figures, 57 references, original in Croatian)

Keywords: expansion microscopy, mitotic spindle, bridging fibres, mitosis

Supervisor: Dr. Iva Tolić, Prof.

Co-supervisor: Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Reviewers:

1. Dr. Mirjana Pavlica, Prof.
2. Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.
3. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Asst. Prof.

Substitute: Dr. Branimir Bertoša, Assoc. Prof.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Stanični ciklus.....	1
1.2. Regulacija staničnog ciklusa.....	2
1.3. Mitoza.....	6
1.4. Diobeno vreteno i njegovi osnovi dijelovi.....	10
1.4.1. Mikrotubuli.....	11
1.4.2. Centrosomi.....	14
1.4.3. Kinetohore.....	15
1.5. Nastajanje diobenog vretena.....	15
1.6. Vizualiziranje stanica.....	18
1.6.1. Fluorescencijska mikroskopija.....	19
1.6.2. Ekspanzijska mikroskopija.....	21
1.7. Cilj istraživanja.....	24
2. MATERIJALI I METODE.....	26
2.1. Stanična kultura.....	26
2.2. Priprema stanica za ekspanzijsku mikroskopiju.....	27
2.3. Protokol za ekspanzijsku mikroskopiju.....	27
2.4. Mikroskopiranje.....	30
2.5. Analiza stanica.....	30
2.5.1. Mjerenje duljine i širine diobenog vretena.....	30
2.5.2. Analiza intenziteta signala fluorescencije premosnih i kinetohornih vlakana u diobenom vretenu.....	32
2.5.3. Mjerenje udaljenosti sestrinskih kinetohora.....	35
2.5.4. Transformacija orijentacije diobenih vretena.....	38
3. REZULTATI.....	39
3.1. Izbor fiksativa za ekspanzijsku mikroskopiju.....	39
3.2. Duljine i širine prometafaznih i metafaznih vretena prije i poslije ekspanzijske mikroskopije.....	44

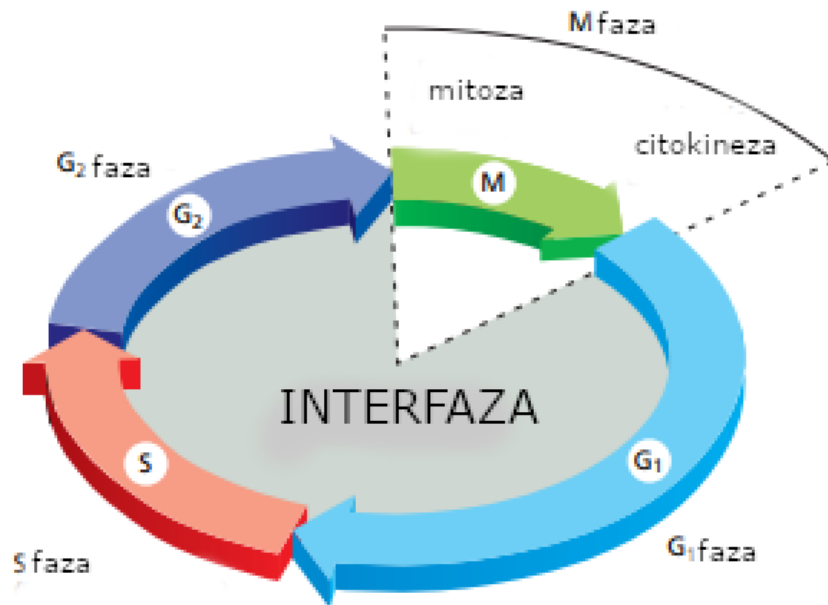
3.3. Broj mikrotubula u prenosnom vlaknu u ekspanziranom diobenom vretenu.....	47
3.4.Udaljenost između sestrinskih kinetohora.....	52
3.5.Horizontalni i vertikalni prikaz diobenog vretena snimljenog pomoću ekspanzijske mikroskopije.....	55
4. RASPRAVA.....	58
4.1. Optimizacija protokola za ekspanzijsku mikroskopiju.....	58
4.2. Fiksacija stanica prije ekspanzijske mikroskopije.....	58
4.3.Mjerenje broja mikrotubula u prenosnom vlaknu.....	60
4.4.Udaljenost između sestrinskih kinetohora.....	61
4.5.Transformacija orijentacije diobenog vretena.....	62
5. ZAKLJUČAK.....	63
6. LITERATURNI IZVORI.....	64
7. ŽIVOTOPIS.....	69

1. UVOD

1.1. Stanični ciklus

Jedini način da se stvori nova stanica je da se udvostruči stanica koja već postoji. Ta jednostavna činjenica, prvi put ustanovljena sredinom 19. stoljeća, sa sobom nosi temeljnu poruku za neprekidnost života. Svi živi organizmi, od jednostanične bakterije do višestaničnog sisavca, su produkti ponavljajućih procesa rasta stanica i podjele koja datira još od početka života na Zemlji, prije više od tri milijarde godina. Stanica se reproducira tako što izvodi uredan slijed događaja u kojima udvostručuje svoj sadržaj te se dijeli na dva dijela. Taj ciklus udvostručavanja i podjele, poznat je kao stanični ciklus, koji je esencijalni mehanizam pomoću kojeg se svi živi organizmi razmnožavaju.

Osnovna funkcija staničnog ciklusa je da točno udvostruči veliku količinu DNA u kromosomima i onda precizno podijeli kopije u dvije, genetički identične stanice kćeri (Alberts i sur., 2007). Stanični ciklus eukariotskih stanica čine četiri usklađena procesa, a to su rast stanice, replikacija genetičkog materijala, raspodjela udvostručenih kromosoma na dvije stanice kćeri i podjela stanice (Cooper i sur., 2004). Ovi procesi definiraju dvije glavne faze staničnog ciklusa. Udvostručenje kromosoma događa se tijekom S faze (S za sintezu DNA), koja zahtijeva 10-12 sati i okupira polovinu staničnog ciklusa u tipičnoj stanici sisavca. Nakon S-faze, segregacija kromosoma i podjela stanice događa se u M-fazi (M kao mitozu), koja zahtijeva dosta manje vremena (manje od sat vremena u stanici sisavca). M faza se sastoji od dva važna događaja: dioba jezgre ili mitozu, tijekom koje su kopirani kromosomi podijeljeni u par jezgri kćeri; i citoplazmatska dioba, ili citokineza, kada se sama stanica dijeli u dvije. Većina stanica zahtijeva puno više vremena za rast i udvostručenje njihove mase proteina i organela, nego što im treba za udvostručenje njihovih kromosoma i diobu. Djelomično da se dopusti više vremena za rast, većina staničnih ciklusa imaju dodatne faze (engl. *gap phase*) – G1 fazu između M faze i S faze i G2 fazu između S faze i mitoze. Prema tome, eukariotski stanični ciklus je tradicionalno podijeljen u četiri uzastopne faze : G1, S, G2 i M. G1, S i G2 faza, zajedno se zovu interfaza. U tipičnoj ljudskoj stanici koja raste u kulturi, interfaza može okupirati 23 sata od 24-satnog staničnog ciklusa, s jednim satom za M fazu. Rast stanice se događa kroz stanični ciklus, osim tijekom mitoze (Alberts i sur., 2007). Dakle, stanica preko 95% vremena provodi u interfazi (Cooper i sur., 2004). Raspored faza staničnog ciklusa, prikazan je na **slici 1**.



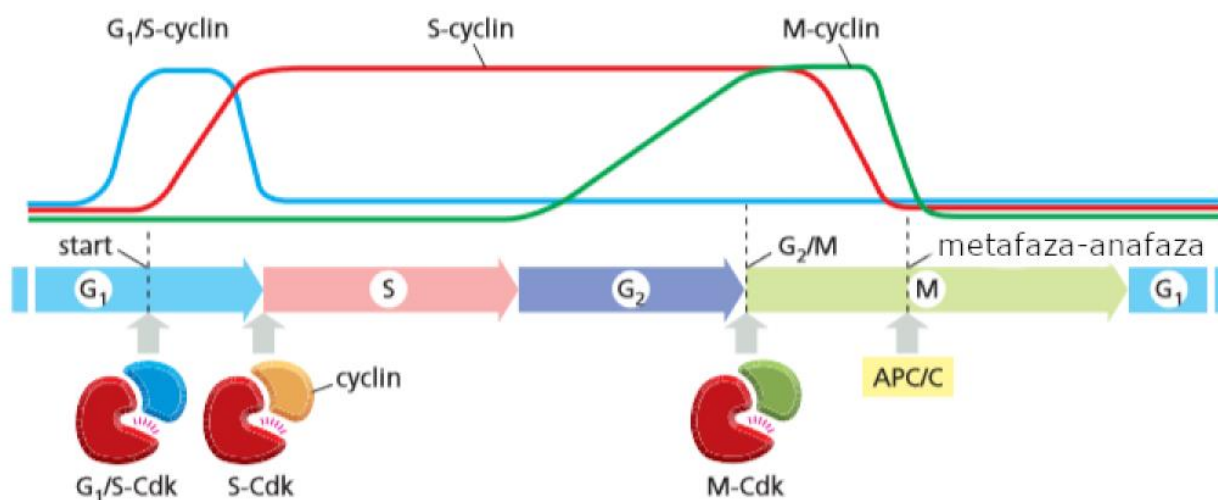
Slika 1. **Četiri faze staničnog ciklusa.** Stanični ciklus eukariotskih stanica može se podijeliti u četiri faze: G₁, S, G₂ i M-faza. Ključni procesi u staničnom ciklusu, kao što su replikacija DNA, mitozu i citokinezu, regulirani su kontrolnim točkama. Analogno satu, kontrolni sustav središnji je dio staničnog ciklusa koji potiče nužne procese vremenski uvijek istim redoslijedom. U većini stanica, G faze razdvajaju glavne događaje S i M faze (preuzeto i prilagođeno: Alberts i sur., 2007).

1.2. Regulacija staničnog ciklusa

Regulacija staničnog ciklusa ovisi o različitim unutarstaničnim i izvanstaničnim signalima. Ukoliko se stanica nađe u nepovoljnim uvjetima ili ne može završiti s nekom fazom ciklusa, regulacijski sustav će zaustaviti stanični ciklus. Osnovne sastavnice sustava kontrole staničnog ciklusa su ciklini i kinaze ovisne o ciklinu, Cdk (engl. *cyclin dependent kinases*). Ciklini su proteini koji aktivacijom ciklin-ovisnih kinaza reguliraju prolazak stanice kroz stanični ciklus (Galderisi i sur., 2003) (slika 2.). Ove proteine prvi je opisao R. Timothy Hunt 1982. godine prilikom proučavanja staničnog ciklusa morskog ježa (Jackson, 2008). Aktivne Cdk fosforiliraju različite unutarstanične ciljne proteine, te na taj način potiču i reguliraju različite događaje tijekom staničnog ciklusa. Razina se Cdk ne mijenja tijekom staničnog ciklusa, dok se njihova aktivnost

mijenja. Aktivnost Cdk regulirana je preko najmanje četiri molekularna mehanizma. Pojedini ciklini i kinaze ovisne o ciklinu formiraju ciklin-Cdk komplekse, a oscilacije u aktivnosti takvih kompleksa pokreću različite stanične procese. Tako će aktivacijom kompleksa ciklina S faze i Cdk (S-Cdk) započeti S faza staničnog ciklusa, a aktivacijom ciklina M faze i Cdk (M-Cdk) započinje mitozu. Pojedini će ciklini biti prisutni samo u fazi ciklusa kojeg oni potiču, a u ostalim fazama ciklusa ih nema. Mehanizmi koji kontroliraju aktivnost kompleksa ciklin-Cdk su fosforilacija podjedinica kinaza ovisnih o ciklinu, vezanje Cdk inhibitora, CKI, (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor*) na komplekse ciklin-Cdk, te aktivnost ubikvitin – protein ligaza (Alberts i sur., 2007). Uloga ubikvitina je označavanje onih proteina koji će se razgraditi u proteasomu (Shang i Taylor, 2011). Dvije najvažnije ubikvitin - ligaze u regulaciji staničnog ciklusa su APC/C (engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*) i SCF ubikvitin – ligaza, čiji naziv govori od kojih se podjedinica sastoji (Skp1, Cullin, F-box protein) (Vodermaier, 2004).

Prvi mehanizam uključuje spajanje Cdk sa svojim ciklinskim partnerom. Porodicu proteina ciklina, koji određuju aktivnost Cdk, možemo podijeliti u četiri razreda: G1-ciklini, G1/S-ciklini, S-ciklini i M-ciklini. Kod različitih svojih organizama postoji različita nomenklatura pojedinačnih ciklina. Razina ciklina stalno se mijenja tijekom staničnog ciklusa tj. ciklini se periodički akumuliraju i degradiraju. Protein-kinaze su djelomično aktivne kada su ciklini čvrsto povezani na njih. Drugi mehanizam uključuje aktivirajuću fosforilaciju Cdk koju katalizira enzim nazvan CAK (kinaza koja aktivira Cdk, engl. *Cdk-activating kinase*). Fosforilacija Cdk, koju katalizira CAK u blizini aktivnog mjesta enzima, uzrokuje malu konformacijsku promjenu koja povećava aktivnost Cdk. Treći mehanizam regulacije Cdk uključuje inhibicijsku fosforilaciju, što katalizira protein-kinaza Wee1. Cdk se može ponovno aktivirati defosforilacijom istog mjesta pomoću protein-fosfataze iz obitelji Cdc25. Četvrti mehanizam uključuje povezivanje s inhibitorima Cdk (CKI) koji potiču veliku konformacijsku promjenu u strukturi aktivnog mjesta i inaktiviraju Cdk (Alberts i sur., 2007).

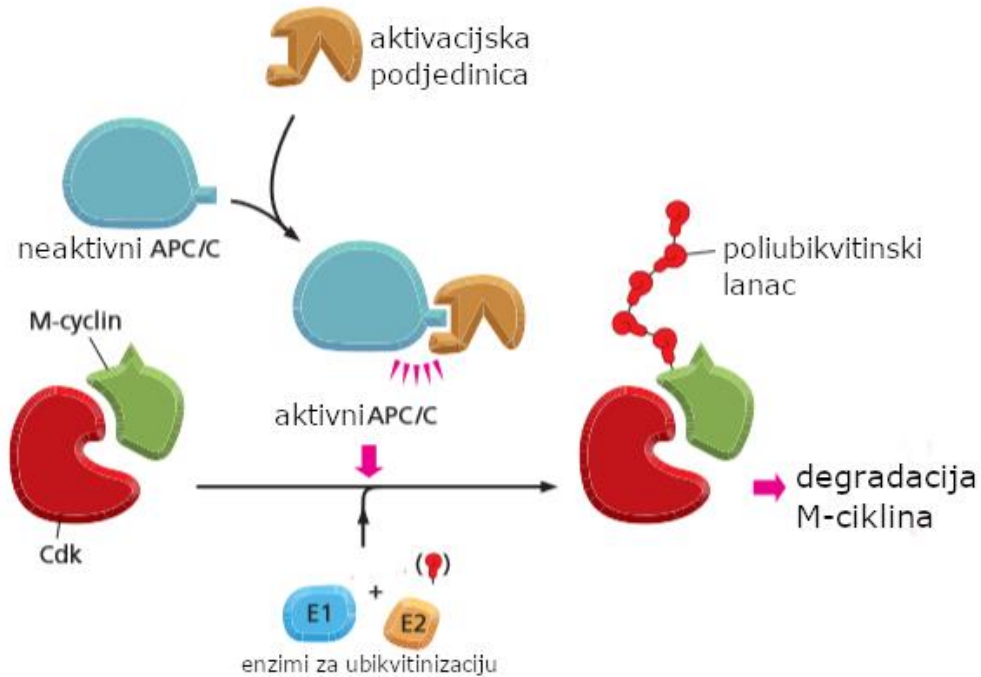


Slika 2. **Ciklin-Cdk kompleksi u regulaciji staničnog ciklusa.** Koncentracije tri glavna tipa ciklina osciliraju tijekom staničnog ciklusa, dok se koncentracije Cdk-a (nisu prikazane) ne mijenjaju. U kasnoj G₁ fazi, povećana koncentracija G₁/S-ciklina dovodi do formiranja G₁/S-Cdk kompleksa koji potiču progresiju kroz START kontrolne točke. S-Cdk kompleksi formiraju se na početku S faze i potiču replikaciju DNA, kao i neke rane mitotičke događaje. M-Cdk kompleksi se formiraju tijekom G₂ faze, ali se održavaju neaktivnima uz pomoć određenih mehanizama. Ovi kompleksi se aktiviraju na kraju G₂ faze i potiču rane događaje u mitozu. Odvojeni regulacijski protein, APC/C koji se spominje kasnije u tekstu, inicira tranziciju iz metafaze u anafazu (preuzeto i prilagođeno: Alberts i sur., 2007).

U staničnom ciklusu postoje tri glavne kontrolne točke. U kasnoj G₁-fazi je prva kontrolna točka staničnog ciklusa nazvana START (kod kvasaca) ili restriksijska točka (kod sisavaca). Ako su izvanstanični uvjeti povoljni za stanicu, stanica prolazi kontrolnu točku te je dopuštena replikacija DNA. Druga G₂/M kontrolna točka ne dopušta ulazak u mitozu dok se genom potpuno ne udvostruči. Kontrolni mehanizam regulira rane događaje u mitozu koji vode do poravnanja kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini u metafazi. Također provjerava jesu li izvanstanični uvjeti povoljni za ulazak u mitozu te postoje li oštećenja DNA. Treća kontrolna točka u M-fazi regulira prelazak iz metafaze u anafazu. Naziva se još i SAC (kontrolna točka diobenog vretena engl. *spindle assembly checkpoint*). Provjerava jesu li sve sestrinske kromatide pravilno orijentirane

prema suprotnim polovima diobenog vretena. Ako su uvjeti kontrolne točke zadovoljeni, stanica nastavlja progresiju kasnih događaja u mitozu.

Tijekom staničnog ciklusa, ključnu ulogu u regulaciji imaju periodičke proteolize specifičnih proteina. Ključnu ulogu u proteolizi tih specifičnih proteina ima ubikvitin - ligaza APC/C (kompleks koji potiče anafazu engl. *anaphase promoting complex or cyclosome*). Ubikvitin - ligaza APC/C proteolitički razgrađuje sekurin te tako omogućuje razdvajanje sestrinskih kromatida u anafazi. Također, proteolitički razgrađuje S- i M cikline što inaktivira većinu kinaza Cdk u stanici uzrokujući tako globalnu defosforilaciju nakon metafaze. Aktivnost ubikvitin - ligaze APC/C regulirana je preko njenih aktivirajućih podjedinica Cdc20 tijekom anafaze i Cdh1 od kasne mitoze do rane G1 faze (Alberts i sur., 2007). **Slika 3.** prikazuje regulaciju aktivacije ubikvitin - ligaze APC/C.



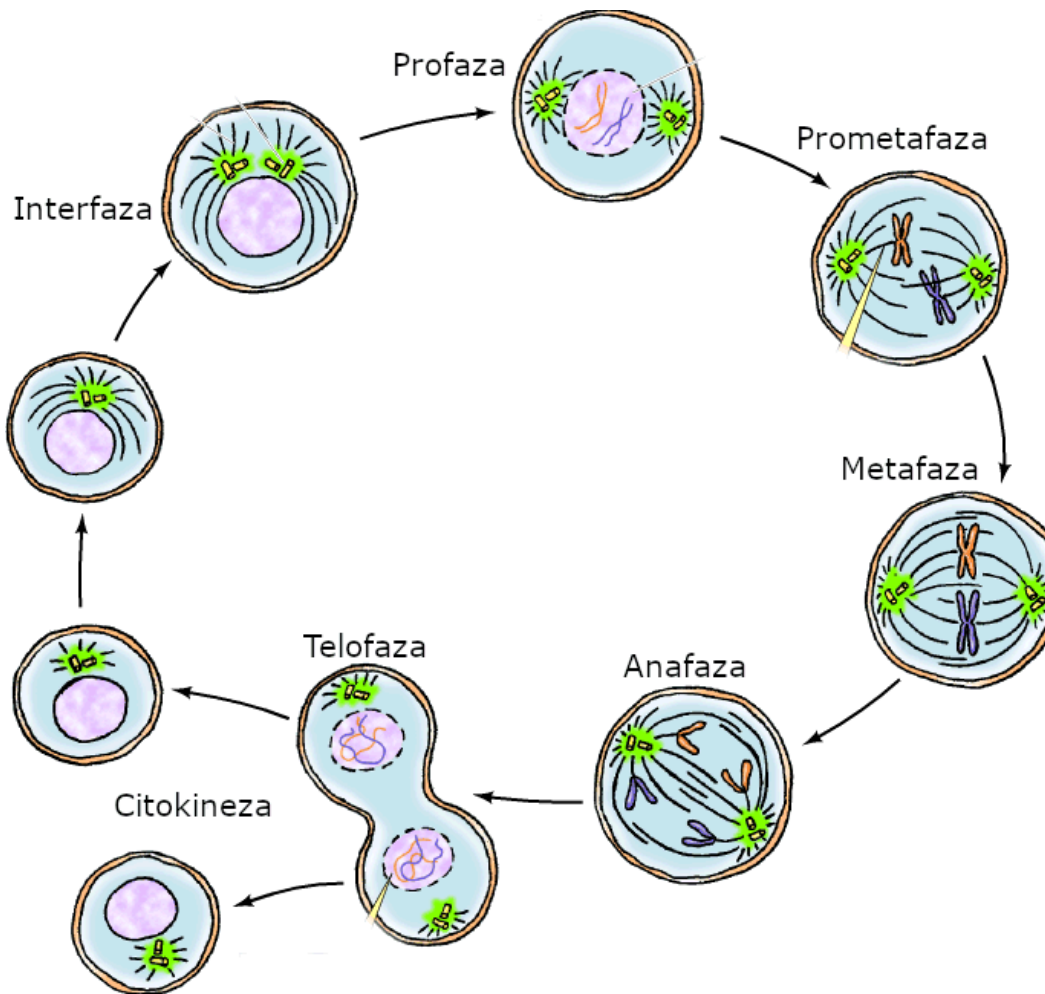
Slika 3. **Regulacija aktivacije ubikvitin-ligaze APC/C.** Ubikvitin-ligaza ključni je regulator napredovanja iz metafaze u anafazu. Kompleks APC/C reguliran je preko aktivacijske podjedinice Cdc20 koja pomaže u prepoznavanju aminokiselinske sekvence M-ciklina i drugih ciljnih proteina. Dodatni proteini E1 i E2 pomažu u dodavanju molekula ubikvitina na ciljni protein (preuzeto i prilagođeno: Alberts i sur., 2007).

1.3. Mitoza

Nakon završetka S faze i tranzicije kroz G2, stanica prolazi kroz dramatičan preokret M faze. To počinje s mitozom, tijekom koje se sestrinske kromatide razdvajaju i raspodjeljuju u par identičnih jezgra kćeri, svaka sa svojom kopijom genoma. Mitoza je tradicionalno podijeljena u pet stadija – profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu – definirane primarno na bazi ponašanja kromosoma koje se može vidjeti mikroskopom.

Tijekom profaze kromosomi se kondenziraju i centrosomi se kreću na suprotne strane jezgre. Budući da se kromatin skraćuje oko 10000 puta, zgusnuti kromosomi se mogu vidjeti svjetlosnim mikroskopom (McIntosh i sur., 2012). Događaj koji označava prijelaz iz profaze u prometafazu je puknuće jezgrine ovojnice, NEB (engl. *nuclear envelope breakdown*). Ovaj događaj je posljedica

aktivnosti MCdk koja će fosforilirati proteine jezgrine ovojnice, a to će dovesti do depolimerizacije jezgrine ovojnice na manje komplekse (Beaudouin i sur., 2002). Započinje formiranje diobenog vretena. Tijekom prometafaze mikrotubuli diobenog vretena vežu se na kinetohore kondenziranih kromosoma te dolazi do deorganizacije jezgrine ovojnice. Kada se sestrinske kromatide pravilno orijentiraju prema suprotnim polovima, započinju dinamičke oscilacije kromosoma sve do pravilnog poravnanja u ekvatorijalnoj ravnini. Pravilno poravnanje kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini odvija se u metafazi. Stanica se zadržava u metafazi sve dok nisu zadovoljeni uvjeti kontrolne točke u M-fazi. U anafazi djelovanjem motornih proteina i depolimerizacijom mikrotubula dolazi do povlačenja kromatida prema suprotnim polovima diobenog vretena, ali se kromatide ne razdvajaju dok APC/C ubikvitin - ligaza ne označi protein sekurin za razgradnju (Lu i sur., 2014). Sestrinske kromatide kreću se prema suprotnim polovima u anafazi A, te se polovi odvajaju jedan od drugog u anafazi B. Djelovanjem fosfataze Cdc14 dolazi do dekonenzacije kromosoma, a u telofazi će još ponovno nastati jezgrina ovojnica i razgradit će se diobeno vreteno (Stegmeier i Amon, 2004). Proces podjele citoplazme (citokineza) započinje formiranjem kontraktilnog prstena, koji se sastoji od aktinskih vlakana i miozina II, još tijekom anafaze. Na **slici 4.** prikazane su faze stanične diobe – mitoze.

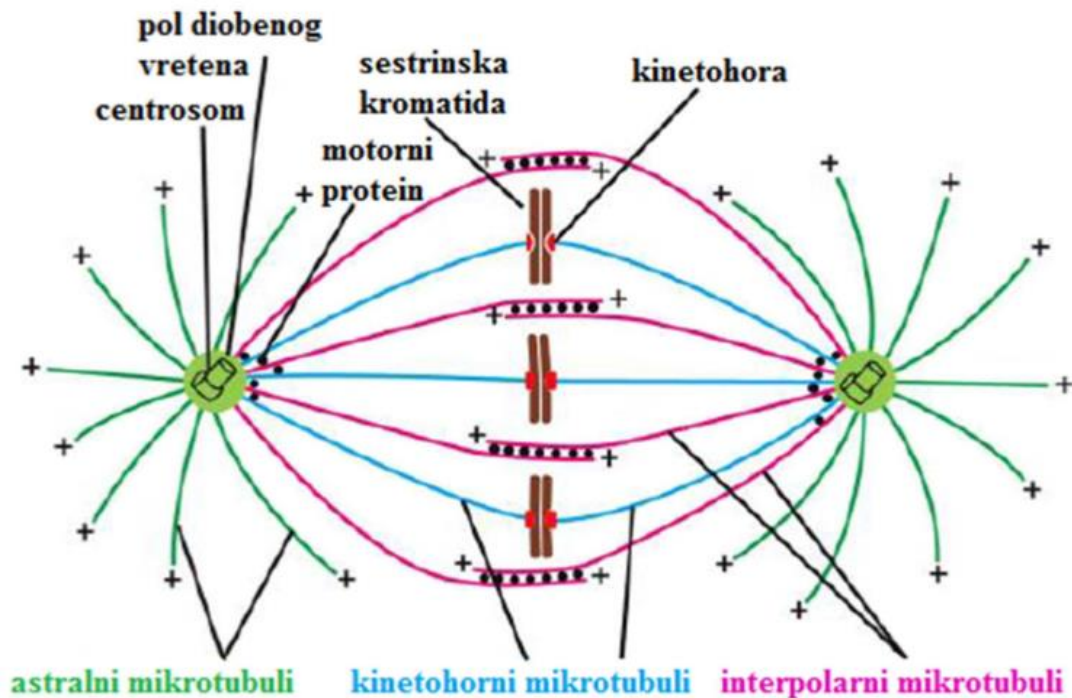


Slika 4. **Faze mitoze.** Tijekom profaze kromosomi se kondenziraju i centrosomi se kreću prema suprotnim stranama jezgre. Započinje formiranje diobenog vretena. Dolazi do de-organizacije jezgrine ovojnice i povezivanja mikrotubula na kinetohore kromosoma. Tijekom prometafaze kromosomi se dinamički kreću sve do poravnanja u ekvatorijalnoj ravnini (metafaza). U anafazi dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida i odmicanja polova diobenog vretena. Mitoza završava ponovnom reorganizacijom jezgrine ovojnice i dekondenzacijom kromosoma u telofazi. Proces citokineze dijeli dvije stanice koje ulaze u interfazu. Svaka stanica nasljeđuje jedan centrosom koji se duplicira prije sljedeće mitoze (preuzeto i prilagođeno: Cooper i sur., 2004).

Prema komponentama regulacije staničnog ciklusa, mitozu možemo podijeliti na dva ključna dijela. Prvi događaji u ranoj mitozu (profaza, prometafaza i metafaza) potaknuti su kontrolnom točkom u G2/M fazi i akumulacijom M-ciklina. Kompleks M-ciklin-Cdk fosforilira različite ciljne proteine koji dovode do formiranja diobenog vretena i poravnanja kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini. Događaji u ranoj mitozu regulirani su sa još dvije dodatne porodice protein-kinaza, Polo-kinaze i Aurora-kinaze, koje su regulirane fosforilacijom koju katalizira kompleks M-ciklin-Cdk. Polo-kinaza Plk ključna je za normalno formiranje diobenog vretena, kinaza Aurora-A kontrolira proteine koji sudjeluju u formiranju i stabilizaciji diobenog vretena, a kinaza Aurora-B kontrolira povezivanje sestrinskih kromatida na diobeno vreteno. Drugi događaji u kasnoj mitozu započinju prijelazom iz metafaze u anafazu, kada kompleks APC/C potiče razgradnju komponenti kohezin-kompleksa i odvajanje sestrinskih kromatida. Kompleks APC/C također potiče razgradnju ciklina koja vodi do inaktivacije kinaza Cdk i defosforilacije Cdk ciljnih proteina, što dovodi do završavanja anafaze, deorganizacije mikrotubula diobenog vretena i podjele cijele stanice procesom citokineze. Nadalje, kinaza Aurora B ključni je protein koji regulira i mehanizam prepoznavanja sile napetosti između sestrinskih kinetohora (engl. *tension-sensing mechanism*) na kinetohornom kompleksu. Prilikom povezivanja sestrinskih kromatida na suprotne polove, ključnu ulogu imaju orijentacija leđa-o-leđa sestrinskih kinetohora i sile napetosti. Sile napetosti koje se uspostavljaju u blizini kinetohore destabiliziraju nepravilno povezivanje sestrinskih kinetohora. Kada dođe do pravilnog povezivanja Aurora B smanjuje fosforilaciju kinetohore povećavajući stabilnost mjesta vezanja. Sve do pravilnog povezivanja zadnjeg sestrinskog kinetohornog para, nepravilno povezane kinetohore šalju negativni signal koji blokira aktivaciju Cdc20-APC/C blokirajući tako prijelaz iz metafaze u anafazu. Skoufias i suradnici (2001) pokazali su kako je prepoznavanje povezanosti sestrinskih kinetohora na suprotne polove i prepoznavanje sile napetosti između sestrinskih kinetohora u kontrolnoj točki SAC posredovano proteinima Mad2 i Bub1. Protein Mad2 preko interakcije sa Cdc20 regulira aktivnost kompleksa APC/C (Amon, 1999; Welburn i sur., 2011), dok protein Bub1 prepoznaje uspostavljenu silu napetosti između sestrinskih kinetohora i povezuje se s Cdc20 neovisno o proteinu Mad2 (Tang i sur., 2001).

1.4. Diobeno vreteno i njegovi osnovni dijelovi

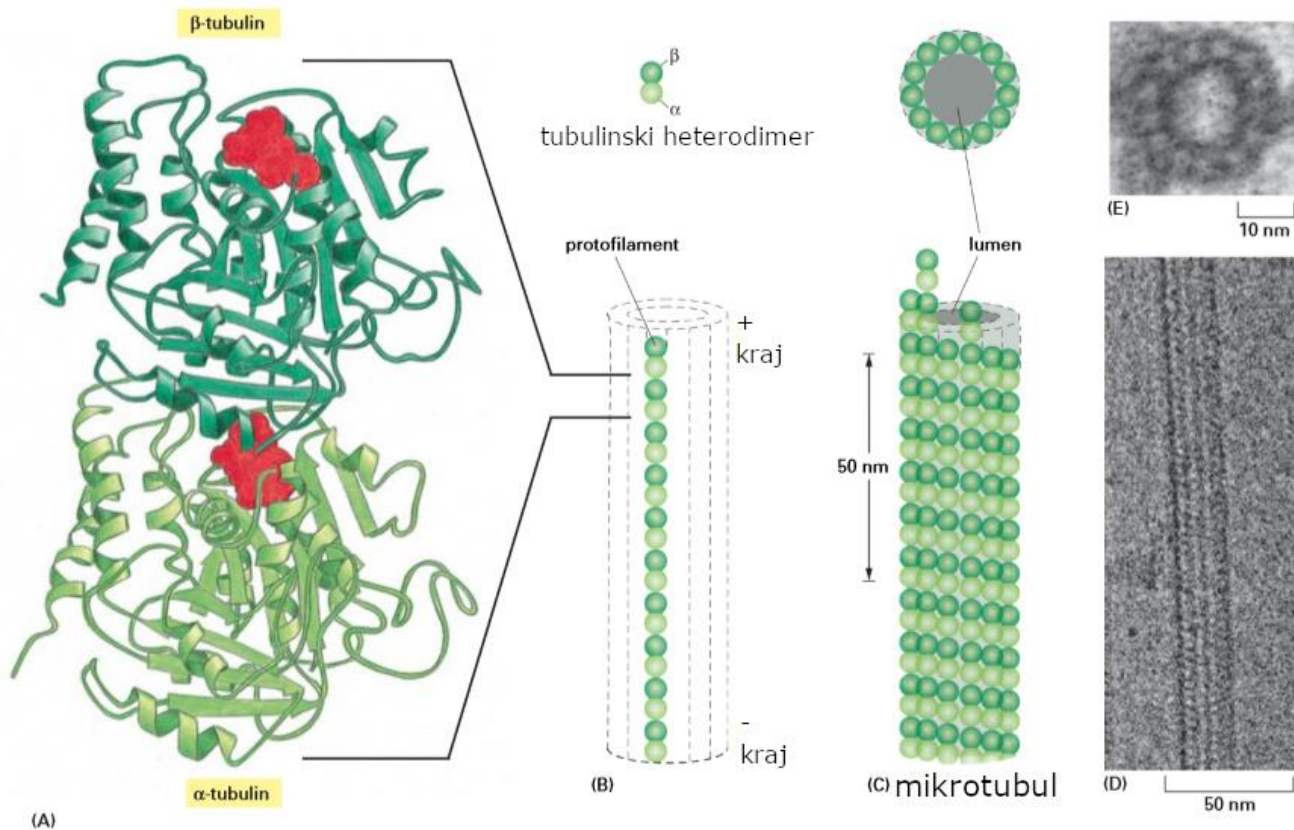
Na početku stanične diobe stanica konstruira diobeno vreteno. Uloga ovog složenog citoskeletnog mehanizma je da fizički podijeli genetički materijal između novonastalih stanica kćeri (Pavin i Tolić, 2016). U ovom poglavlju su opisani osnovni dijelovi diobenog vretena, a klasični prikaz diobenog vretena dan je na **slici 5**.



Slika 5. Klasični prikaz diobenog vretena s označenim osnovnim dijelovima. Mitotičko vreteno izgrađeno je od astralnih, kinetohornih i interpolarnih mikrotubula. Osnovni dijelovi diobenog vretena su i centrosomi, motorni proteini te kinetohore (preuzeto i prilagođeno: Alberts i sur., 2007).

1.4.1. Mikrotubuli

Mikrotubuli su stanični filamenti koji imaju ključnu ulogu u diobi stanica (van Buren i sur., 2005) čija je struktura prikazana na **slici 6**. Građeni su od heterodimernog proteina tubulina čije su podjedinice α -tubulin i β -tubulin. Podjedinice tubulina izgrađuju protofilamente, a kružnim povezivanjem 13 protofilamenata nastaju mikrocjevčice nazvane mikrotubuli. Mikrotubuli nastaju polimerizacijom heterodimera α -tubulina i β -tubulina uz energiju koja se oslobađa hidrolizom GTP-a (Cooper i sur., 2004). Pri polimerizaciji se javlja brzorastući „plus“ kraj kojem je izložen β -tubulin, dok je na spororastućem „minus“ kraju vlakna izložen α -tubulin. Osim što će mikrotubuli polimerizacijom rasti, oni se mogu i skraćivati depolimerizacijom. Ovaj fenomen izmjene rasta i skraćivanja mikrotubula nazvan je dinamička nestabilnost (Mitchison i Kirschner, 1984). Uz mikrotubule se vežu proteini poput proteina MAP (engl. *microtubule associated proteins*) proteina i motornih proteina (kinezini i dineini) (Maiato i sur., 2004). Kod evolucijski starijih organizama, mikrotubuli isključivo imaju ulogu u sastavljanju diobenog vretena, što ukazuje kako su se prvotno razvili za funkciju mitoze (Imoto i sur., 2011).

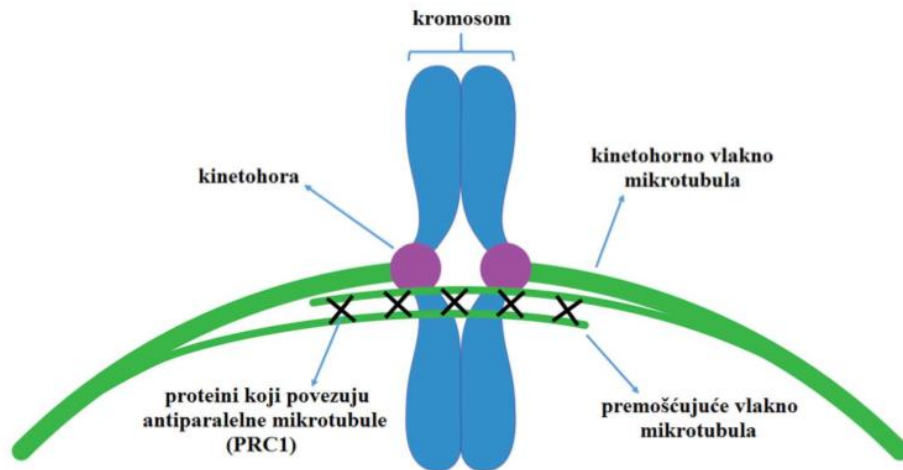


Slika 6. **Struktura mikrotubula i njegovih podjedinica.** (A) Tubulinski heterodimer je podjedinica svakog protofilamenta koja nastaje čvrstim povezivanjem α -tubulina i β -tubulina. Dok je molekula GTP čvrsto povezana na α -tubulin, na β -tubulin je slabije povezana te sudjeluje u dinamici mikrotubula. Nukleotidi GTP prikazani su crvenom bojom. (B) Shematski su prikazani jedna podjedinica mikrotubula (tubulinski heterodimer) i jedan protofilament. Tubulinski heterodimeri jednako su orijentirani u svakom protofilamentu. (C) Mikrotubul je čvrsta cilindrična struktura izgrađena od 13 paralelnih i lateralno povezanih protofilamenata (Preuzeto i prilagođeno: Alberts i sur., 2007).

Mikrotubule možemo podijeliti na kinetohorne i ne-kinetohorne mikrotubule. Kinetohorni mikrotubuli su paralelni filamenti koji se polimeriziraju iz centrosoma i pričvršćuju na kinetohore kao kinetohorna vlakna, k-vlakna (engl. *k-fibers*). S druge strane, ne-kinetohorni mikrotubuli se neće vezati na kinetohore, već će međusobno stvarati preklapajuće regije kao antiparalelni snopovi

(Kajtez i sur., 2016). Ovi ne-kinetohorni mikrotubuli, koji u središnjem dijelu diobenog vretena stvaraju antiparalelne nizove, nazivaju se interpolarni mikrotubuli. Treba napomenuti kako postoje i ne-kinetohorni mikrotubuli koji polimeriziraju radijalno od polova diobenog vretena. Oni povezuju diobeno vreteno sa staničnim korteksom, a zbog smjera rasta su nazvani astralni mikrotubuli (Mastronarde i sur., 1993).

Posljednjih godina dokazano je postojanje još jedne vrste interpolarnih mikrotubula koji se nalaze jako blizu sestrinskih kinetohora i tvore strukturu koja podsjeća na most. Iz tog je razloga ova nova vrsta mikrotubula nazvana premošćujući ili prenosni mikrotubuli (engl. *bridging microtubules*), a vlakna koja tvore su premošćujuća vlakna (Pavin i Tolić, 2016; Kajtez i sur., 2016). Ova ne-kinetohorna vlakna u blizini kinetohornih vlakna, a između sestrinskih kinetohora, prethodno su uočena i elektronskom mikroskopijom (McDonald i sur., 1992; Ohi i sur., 2003; Tolić i Pavin, 2016). Da postoji poveznica između premošćujućih mikrotubula te sestrinskih kinetohora i kinetohornih vlakana pokazano je laserskom ablacijom. Laserska ablacija podrazumijeva postupak zarezivanja kinetohornog vlakna diobenog vretena. Kao rezultat ablacije dobiveno je zajedničko kretanje premošćujućeg vlakna, snopa mikrotubula koji nije ablatiran, sestrinskih kinetohora i dijela ablatiranog kinetohornog vlakna. Takav rezultat potvrđuje povezanost premošćujućeg vlakna s kinetohornim vlaknima i sestrinskim kinetohorama u jedinstveni element (Kajtez i sur., 2016; Milas i Tolić, 2016; Tolić i Pavin, 2016; Vukušić i Buđa, 2016). Nova vrsta mikrotubula prikazana je **na slici 7**. Valja još napomenuti, kao što se vidi na slici 7, da je premošćujuće vlakno vrsta antiparalelnog vlakna. Potvrda da je ovo vlakno zaista sastavljeno od ne-kinetohornih mikrotubula koji se preklapaju antiparalelno, dolazi iz činjenice da se na njemu nalazi protein regulator citokineze 1, PRC1 (engl. *protein regulator of cytokinesis*) (Kajtez i sur., 2016). PRC1 protein je član obitelji nemotornih proteina Ase1p koji se veže na preklapajuće dijelova antiparalelnih mikrotubula (Bielig i sur., 2010).



Slika 7. Prikaz strukture koja obuhvaća premosno vlakno povezano s kinetohornim vlaknom i pritom se nalazi između sestrinskih kinetohora. Pojedini elementi ove strukture označeni su na slici (preuzeto i prilagođeno: Simunić i Tolić, 2016).

1.4.2. Centrosomi

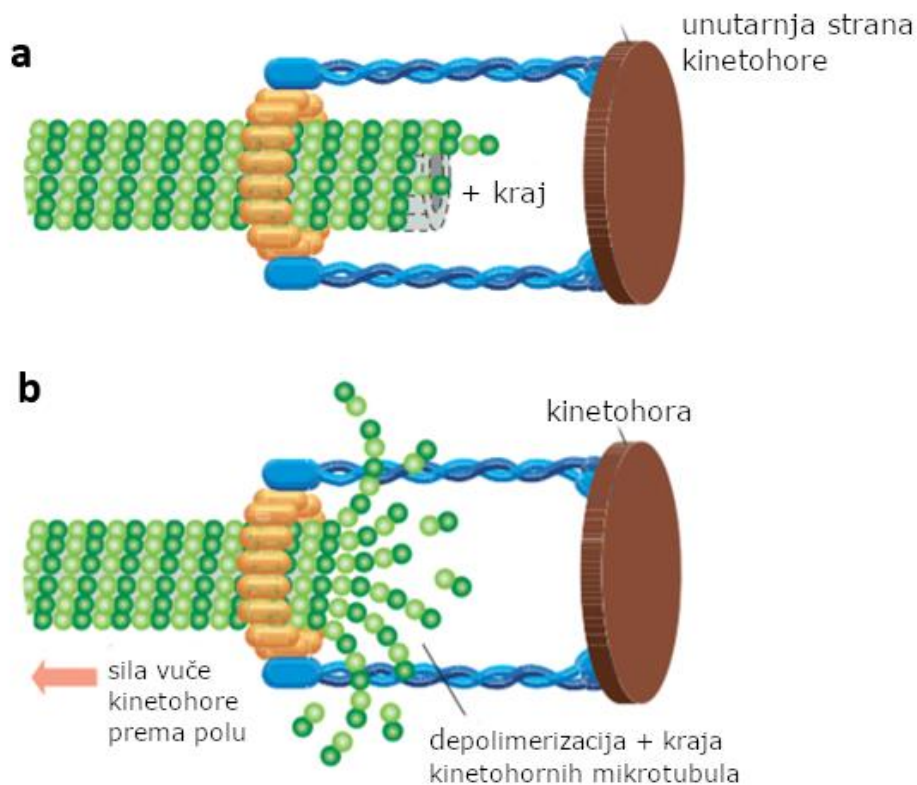
Centrosomi su stanične strukture koje su glavna organizacijska središta mikrotubula u stanici. Svaki centrosom izgrađuje par centriola koje se nalaze u pericentriolnom matriksu (Nigg i Stearns, 2011). U G1 fazi staničnog ciklusa centrioli se razdvoje na nekoliko mikrometara. Tijekom S faze započinje rast centriola kćeri pokraj svakog centriola majke i to pod kutom od 90° . Majčinski centriol je duži i kompaktnije građen od centriola kćeri. U G2 fazi završava elongacija centriola kćeri, ali parovi centriola ostaju i dalje blizu sve do početka M faze. Kad stanice uđu u M fazu stanične diobe, dvije polovice repliciranog centrosoma se podijele i udalje kako bi započele stvaranje polova diobenog vretena. U toj će fazi diobe svaki centrosom započeti stvarati vlastite mikrotubule (Firat-Karalat i Stearns, 2014).

1.4.3. Kinetohore

Kinetohore su proteinske strukture na kromatidama čija je uloga povezivanje kromosoma sa snopovima mikrotubula diobenog vretena. Pravilno povezivanje mikrotubula i kromosoma krucijalno je za ispravno dijeljenje stanice (Cojoc i sur., 2016). Kinetohorni kompleks se može podijeliti na unutarnji dio koji je usko povezan s centromernom DNA i vanjski dio koji omogućuje povezivanje s mikrotubulima. Jedan od proteina unutarnjeg dijela kinetohornog kompleksa je centromerni protein CENP-A. Ovaj protein od 17 kDa po strukturi i svojstvima sličan je histonu H3, a posebno je istaknut jer će kasnije biti spominjan u ovom radu (Tachiwana i sur., 2012; Tachiwana i sur., 2011). Tijekom prometafaze, mikrotubuli će polimerizacijom rasti iz centrosoma i nasumičnim gibanjem tražiti kinetohore te se povezivati s njima. U trenutku kad se obje sestrinske kinetohore povežu sa snopovima mikrotubula, koji dolaze sa suprotnih polova stanice, kažemo da je postignuta biorijentacija. Tek kad su svi kinetohorni parovi povezani na opisani način, stanica može ući u anafazu (Kalinina i sur., 2012; Cheeseman i Desai, 2008).

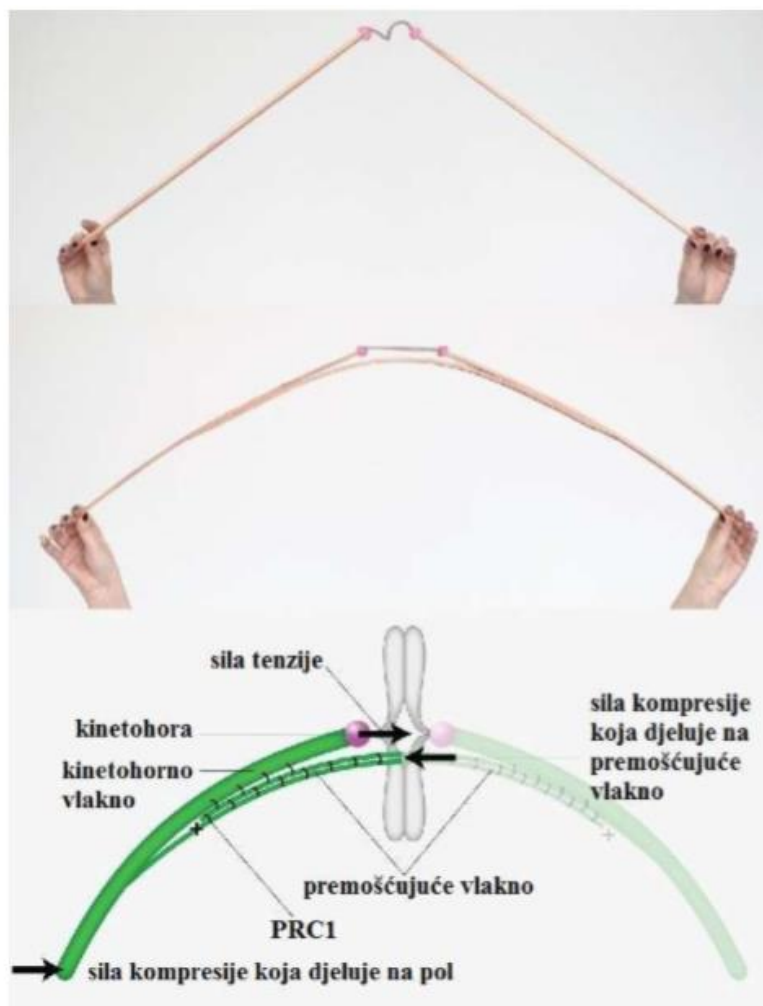
1.5. Nastajanje diobenog vretena

Već je spomenuto kako mikrotubule u diobenom vretenu možemo podijeliti na kinetohorne i ne-kinetohorne mikrotubule. Kinetohorni mikrotubuli povezuju kondenzirane kromosome sa polovima vretena. Plus krajevi kinetohornih mikrotubula povezuju se na kinetohore sestrinskih kromatida (Cheeseman i Desai, 2008). Pokazano je kako se na jedan kinetohorni kompleks kod stanica Hela povezuje oko 20 mikrotubula (Walczak i sur., 2010). Mjesto vezanja mikrotubula na kinetohore prikazano je na **slici 8**. Kinetohore su proteinski kompleksi koji se formiraju u centromernim regijama svake sestrinske kromatide te omogućuju povezivanje udvostručenih kromosoma na diobeno vreteno. Identificirano je više od 80 komponenti kinetohornog kompleksa (Cheeseman i Desai, 2008). Kinetohorni mikrotubuli stabiliziraju se kada se pričvrste na kinetohore (Nicklas, 1981).



Slika 8. **Mjesto vezanja mikrotubula na kinetohore.** (a) Mjesto za vezanje mikrotubula na kinetohori. (b) Način na koji depolimerizacija plus kraja kinetohornog mikrotubula povlači kinetohoru prema polu diobenog vretena. (preuzeto i prilagođeno: Alberts i sur., 2007).

Promatranjem oblika diobenog vretena, primijećeno je da je duljina kinetohornih vlakana veća od udaljenosti između centrosoma. To upućuje na prisutnost sila kompresije na mikrotubule na mjestima centrosoma. S druge strane, centromerna regija je rastegnuta u metafazi stanične diobe, a to je posljedica sile prema polovima diobenog vretena. Dakle, sestrinske kinetohore su pod tenzijom (Kajtez i sur., 2016). Kompresija na polovima i tenzija između kinetohora uravnotežene su ukoliko postoje premošćujući mikrotubuli koji povezuju kinetohorna vlakna vezana na sestrinske kinetohore. Tako je zakrivljeni oblik diobenog vretena posljedica sila unutar ove strukture (Tolić i Pavin, 2016). Raspored sila prikazan je na **slici 9**.



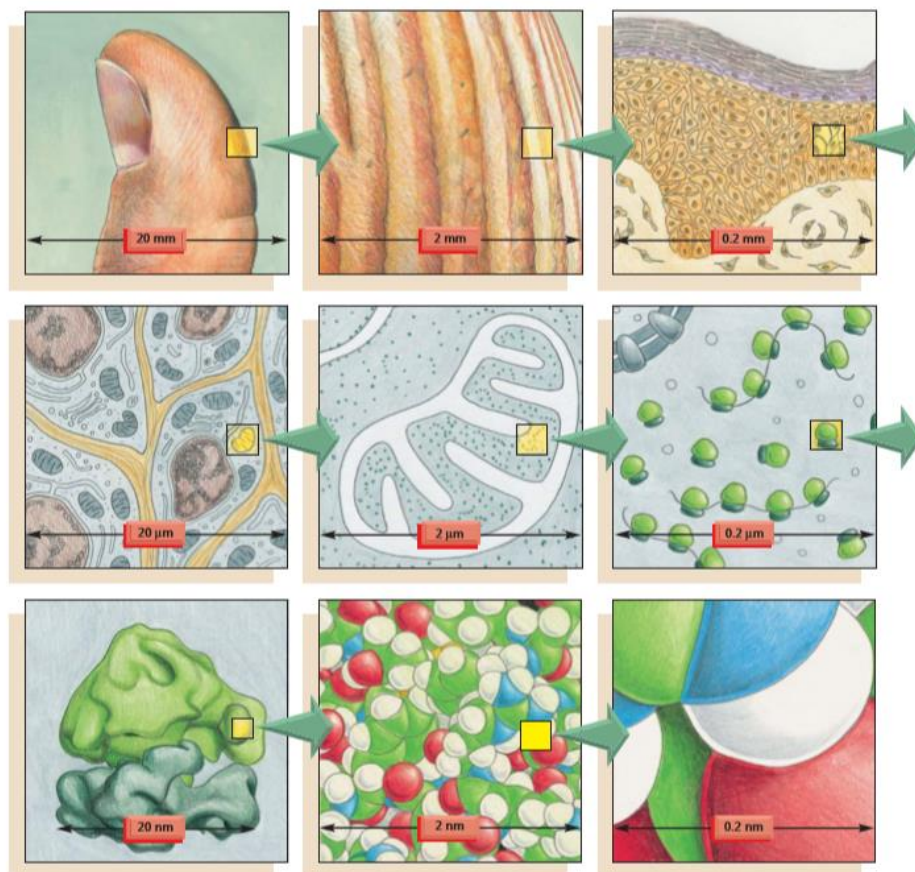
Slika 9. **Prikaz premosnog vlakna na više načina.** Uloga premošćujućeg vlakna pri uravnotežavanju sila prikazana je makroskopskim modelima napravljenim od drvenih štapova i užeta. Model s dva štapa nije zakrivljen i uže je opušteno, dok se kod modela s tri štapa vidi prepoznatljiv konveksan oblik kao posljedica kompresije te uža koje je napeto (preuzeto: Tolić i Pavin, 2016).

1.6. Vizualiziranje stanica

Stanice su male i kompleksne i zbog toga je teško vidjeti njihovu strukturu, otkriti njihov molekularni sastav, a još teže saznati kako njihove raznolike komponente funkcioniraju. Alati koje imamo na raspolaganju određuju što možemo saznati o stanicama, a upoznavanje s novim tehnikama je nedavno rezultiralo velikim prednostima u staničnoj biologiji. Razumijevanje strukturne organizacije stanice je esencijalan preduvjet da bi naučili kako stanica funkcionira.

Da bi razumjeli suvremenu staničnu biologiju, neophodno je znati nešto o njenim metodama. Optička mikroskopija je početna točka jer je razvoj stanične biologije započeo s razvijanjem svjetlosne mikroskopije, koja je i danas nezaobilazan alat. U nedavnim godinama optička mikroskopija je postala još važnija, dugujući to razvoju metoda za specifično označavanje i vizualiziranje pojedinih staničnih komponenti i rekonstrukcije njihove tro-dimenzionalne arhitekture. Važna prednost optičke mikroskopije je činjenica da je svjetlost relativno neuništiva. Označavanjem određenih staničnih dijelova s fluorescentnim oznakama, kao na primjer intrizično fluorescentnim proteinima, možemo promatrati njihovo kretanje, dinamiku i interakciju u živim stanicama.

Optička mikroskopija je limitirana u rezoluciji s valnom duljinom vidljive svjetlosti. Korištenjem snopa elektrona umjesto svjetlosti, elektronska mikroskopija može vizualizirati makromolekularne komplekse unutar stanica na skoro atomskoj rezoluciji i u tri dimenzije. Iako su optička i elektronska mikroskopija važne metode, ono što ih čini zanimljivima je što su omogućile znanstvenicima da otkriju mnoštvo informacija o strukturnoj arhitekturi stanice (Alberts i sur., 2007). Skala između živih stanica i atoma na kojoj je vidljiva granica vidljivosti elektronskog mikroskopa prikazana je na **slici 10**.

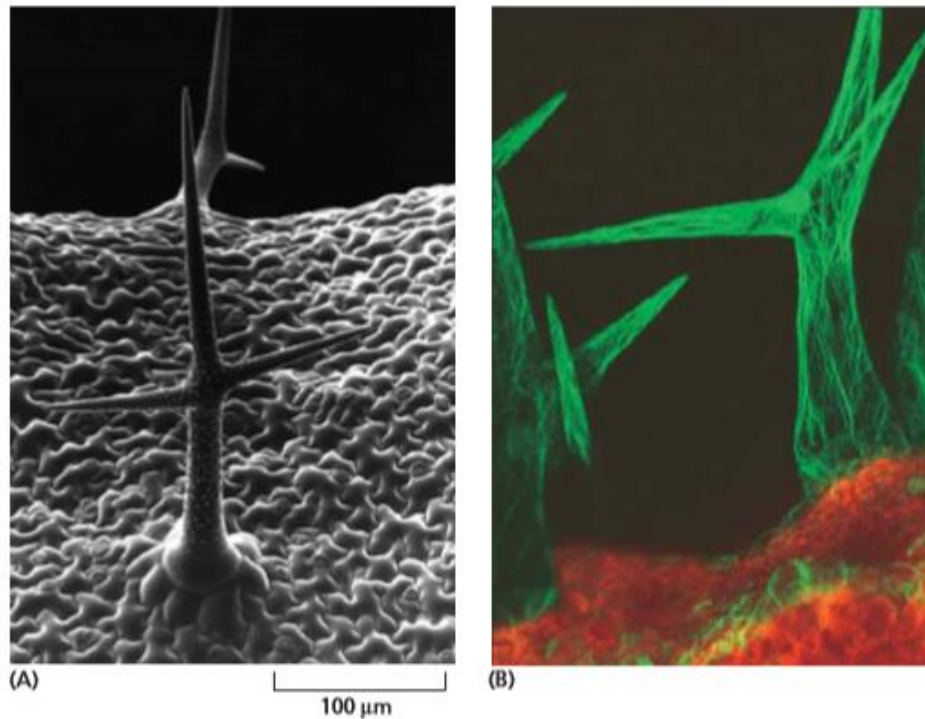


Slika 10. **Skala između živih stanica i atoma.** Svaki dijagram prikazuje sliku povećanu za faktor 10 u imaginarnoj progresiji od palca, kroz stanice kože, do ribosoma, grozda atoma koji tvore dio jedne od mnogih proteinskih molekula u našem tijelu. Atomski detalji makromolekula, koji su prikazani u zadnja dva panela, uglavnom nisu vidljivi ni elektronskom mikroskopu (preuzeto: Alberts i sur., 2007).

1.6.1. Fluorescencijska mikroskopija

Fluorescencijska mikroskopija osjetljiva je metoda istraživanja unutarstanične raspodjele molekula. Korištenje fluorescencijskih mikroskopa ima važnu ulogu u proučavanju diobenog vretena (Balchand, 2016). Prilikom označavanja molekula unutar fiksiranih i živih stanica koriste se fluorescentne boje. Fluorescentna boja apsorbira svjetlost jedne valne duljine, a emitira svjetlost druge valne duljine. Pri vizualizaciji koriste se filteri. Prvi filter dozvoljava osvjetljenje uzorka

svjetlošću valne duljine koja pobuđuje fluorescentnu boju, dok drugi filter dopušta prolazak specifične valne duljine svjetlosti koju pritom emitira fluorescentna boja. Fluorescentne boje emitiraju svjetlost veće valne duljine nakon što budu pobuđene svjetlošću manje valne duljine. Neki od upotrebljavanih fluorescentnih oznaka su: FITC, rodamin, Texas red, AMCA, Cy3 i Cy5, GFP. Molekula GFP pogodna je za praćenje položaja i kretanja proteina u živim stanicama (**Slika 11.**). Današnje metode rekombinantne DNA omogućuju vezanje molekule GFP za bilo koji odabrani protein (Alberts i sur., 2007). Ukoliko se ulazna apertura detektora nalazi u optičkoj ravnini koja je konjugirana fokalnoj ravnini objektiva, fluorescencijski će se mikroskop još nazivati konfokalni mikroskop (Weber, 2004). Konfokalna mikroskopija koristi značajke fluorescencijske mikroskopije. Zajedno s elektroničkom analizom i obradom slike postiže se dobivanje slika s više pojedinosti i jačeg kontrasta. Uski snop laserskog svjetla specifične valne duljine fokusira se na određenu dubinu uzorka. Emitirano svjetlo sakuplja detektor (videokamera). Prije nego emitirano svjetlo stigne do detektora, fluorescentno svjetlo emitirano s uzorka mora proći kroz konfokalnu aperturu. Konfokalna apertura je precizno smještena na mjestu gdje se svjetlo emitirano sa odabrane dubine uzorka nalazi u fokusu. Na taj način se detektira samo fokusirano svjetlo emitirano s odabrane dubine uzorka čime se postiže oštija slika od dobivene slike standardnim fluorescencijskim mikroskopom. Serija slika dobivenih iz različitih dubina može poslužiti za rekonstrukciju trodimenzionalne strukture uzorka koji se ispituje (Alberts i sur., 2007).

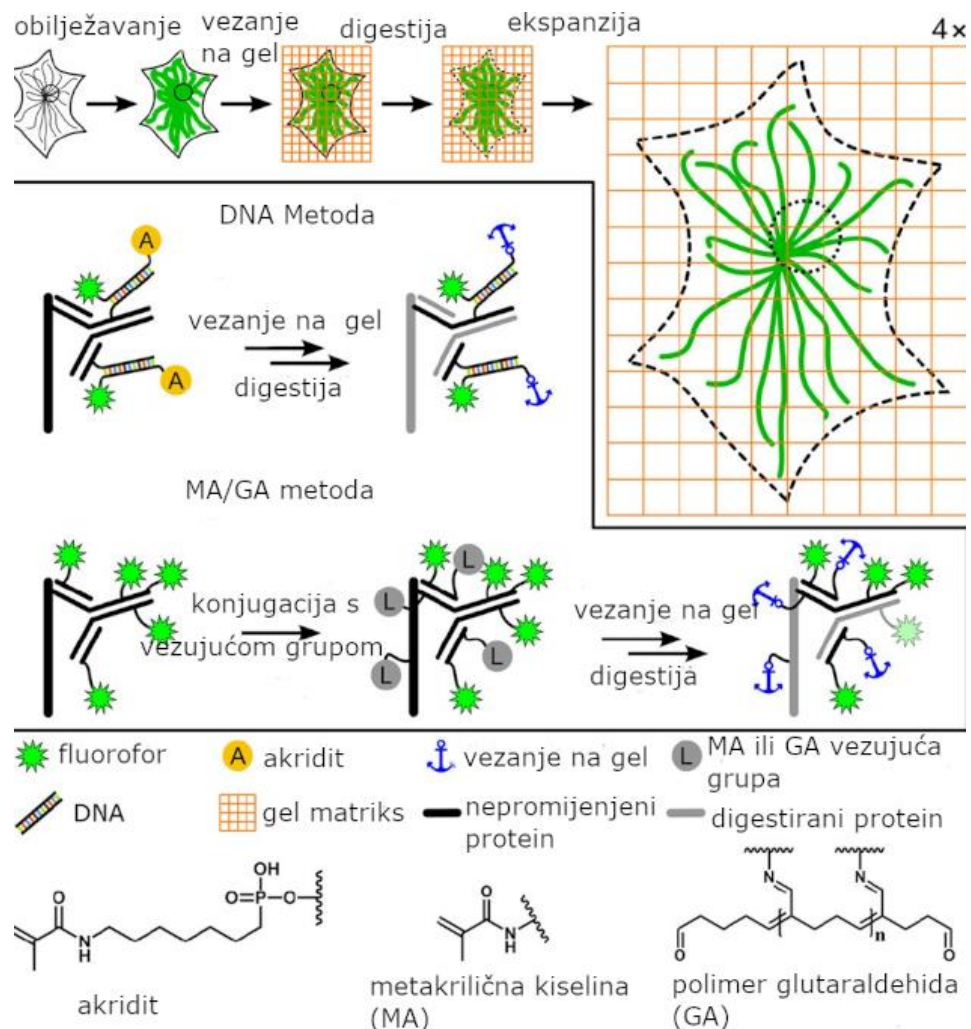


Slika 11. **Proteini označeni GFP molekulom.** (A) Gornja površina lista biljke *Arabidopsis* je pokrivena velikim razgranatim jednostaničnim dlačicama koje se izdižu iz površine epidermisa. Te dlačice ili trihomi, mogu se vidjeti skenirajućim elektronskim mikroskopom. (B) Ako se biljka *Arabidopsis* transformira s DNA sekvencom koja kodira talin (aktin-vezujući protein), fuzirana s DNA sekvencom koja kodira za GFP, fluorescentni talin se veže za aktinske filamente u svim živim stanicama transgene biljke. Konfokalna mikroskopija može otkriti dinamiku cijelog aktinskog citoskeleta trihoma (A, vlasništvo Paula Linstead; B, vlasništvo Jaideepa Mathura, preuzeto: Alberts i sur., 2007).

1.6.2. Ekspanzijska mikroskopija

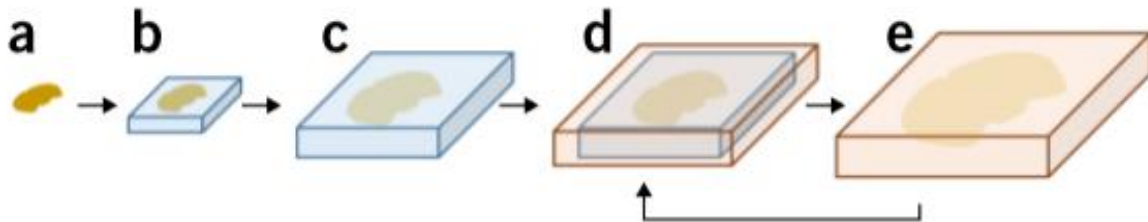
U optičkoj mikroskopiji, sitni strukturni detalji su vidljivi korištenjem prelamanja svjetlosti koja približava sliku uzorka. Otkriveno je da se u uzorku, sintetiziranjem polimera koji ima sposobnost bubrenja u vodi, uzorak može fizički povećati. Kovalentnim vezivanjem specifičnih oznaka lociranih direktno u uzorku na mrežu polimera, oznake koje su smještene bliže od limita optičke mikroskopije, mogu se izotropno razdvojiti i optički razlučiti, pomoću procesa koji se

naziva ekspanzijska mikroskopija (Chen i sur., 2015). Taj inicijalni članak o ekspanzijskom mikroskopiji je demonstriran na stanicama i tkivima koristeći proceduru koja obuhvaća označavanje uzorka s polimer-vezujućim oznakama, rastom polimera unutar uzorka koji se ne veže na oznake, digestija proteazom i ekspanzija polimera. Te polimer-vezujuće oznake, osim što su skupe, oduzimale su dodatna 1-2 dana rada sa stanicama i zato su Chozinski i suradnici (2017) predložili novi protokol za ekspanzijsku mikroskopiju. Razvijene su nove metode za vezanje fluorofora na polimer koje omogućavaju ekspanzijsku mikroskopiju sa standardnim fluorescentno označenim antitijelima i fluorescentnim proteinima (Chozinski i sur., 2017). Za razliku od ostalih super-rezolucijskih metoda koje se oslanjaju na specijalizirane instrumente, ekspanzijska mikroskopija je kompatibilna sa standardnim mikroskopom i zanimljiva je jer je dostupna i može se koristiti i na debelim uzorcima. Shematski prikaz ekspanzijske mikroskopije i strategije s oznakama u gelu prikazan je na **slici 12**.



Slika 12. **Shematski prikaz ekspanzijske mikroskopije i strategije s oznakama u gelu.** Regija koja ja zatvorena crnom linijom ističe razliku između originalne DNA metode (Chen i sur., 2015) i metoda (MA/GA) koje su predstavljene u članku Chozinskog i suradnika (2016). U DNA metodi, uzorak je imuno-označen s posebnim, po mjeri pripremljenim antitijelom koje nosi dvostruko modificiranu DNA vezanu za fluorofor i akriditsku polovicu (A). Za razliku od te metode, s MA-NHS/GA metodama, metakrilična kiselina N-hidroksi sukcinimidil ester (MA-NHS) ili glutaraldehid (GA) se koriste da označe cijeli uzorak s polimer-vezujućim grupama nakon standardnog imuno-označavanja s antitijelima označenim fluoroforima (prikazana su samo sekundarna antitijela) (preuzeto i prilagođeno: Chozinski i sur., 2016).

Nakon preliminarnе ekspanzije, moguće je formirati novu mrežu polimera u prazninama koje su se na novo otvorile tijekom prve ekspanzije, te tako se ekspandirani uzorak, može ekspandirati još jednom što je prikazano na **slici 13**. Ta metoda zove se iterativna ekspanzijska mikroskopija (iExM) u kojoj je uzorak ekspandiran približno 20 puta. Iterativna ekspanzijska mikroskopija omogućuje rezoluciju do 25 nm za vizualiziranje tkiva i stanica na standardnom mikroskopu (Chang i sur., 2017).



Slika 13. **Koncept iterativne ekspanzijske mikroskopije.** (a) Uzorak. (b) Prvo se formira polielektrolitski gel koji ima mogućnost bubrenja i vezan je za uzorak, nakon toga (c) je mehanički homogeniziran i ekspandiran. (d) Nakon ekspanzije, sekundarni polielektrolitski gel s mogućnosti bubrenja je formiran kroz prvi gel i onda (e) ekspandiran, nakon što je razgrađen prvi gel (preuzeto: Chang i sur., 2017).

1.7. Cilj istraživanja

Prvi cilj ovog diplomskog rada je prilagoditi i optimizirati ekspanzijsku mikroskopiju kao metodu koja se može rutinski uspješno koristiti za super-rezolucijsku vizualizaciju proteina od interesa na ekspandiranim fiksiranim stanicama. Drugi cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti arhitekturu diobenog vretena u super-rezoluciji dobivenoj ekspanzijskom mikroskopijom, s posebnim naglaskom na dvije faze stanične diobe, prometafazu i metafazu.

U prometafaznim i metafaznim diobenim vretenima, mjerit će se širina i duljina diobenog vretena u fiksiranim stanicama prije ekspanzije, te širina i duljina diobenog vretena fiksiranih stanica

nakon ekspanzije te će se pomoću tih vrijednosti odrediti faktor ekspanzije. Na ekspanziranom diobenom vretenima, izmjerit će se intenziteti signala fluorescencije prenosnih mikrotubula te snopa prenosnih i kinetohornih mikrotubula i pomoću dobivenih rezultata dobiti informacije o broju mikrotubula u prenosnom vlaknu. Također će se na ekspanziranom diobenom vretenima izmjeriti udaljenost između sestrinskih kinetohora, te će se horizontalna diobena vretena računalnim upravljanjem okrenuti u vertikalna, te obrnuto, radi dobivanja dodatnih informacija o trodimenzionalnoj arhitekturi diobenog vretena.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Stanična kultura

Za provođenje eksperimenta korištene su ljudske stanične linije, od kojih je jedna netumorska imortalizirana linija iz epitela oka - RPE1 (engl. *retinal pigment epithelium 1*), a jedna je tumorska linija koštanog osteosarkoma U2OS. Također za dio eksperimenata korištena je ljudska tumorska stanična linija HeLa-Kyoto BAC koja stabilno eksprimira protein PRC1 obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (PRC1-GFP). Radi se o adherentnim stanicama koje rastu 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 % CO₂ u inkubatoru Galaxy 170S (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Ovako pripremljen medij za održavanje stanica potrebno je filtrirati.

Kulture stanica su presađivane svakih 48-72 sata kada dosegnu 100% konfluentnost. Prvo je potrebno ukloniti medij i isprati stanice s 5 mL sterilnog 1% PBS pufera (engl. *phosphate-buffered saline*). Zatim se stanice odvajaju od podloge dodavanjem 1 mL 1%-tne otopine tripsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin, Njemačka) i inkubiranjem 5 minuta na 37°C. Odljepljene stanice se pomiješaju s 2 mL medija i 500 µL homogene smjese dodajemo u novu posudu za uzgoj u koju smo prethodno dodali 10 mL svježeg DMEM hranjivog medija. Kulture stanica održavane su u inkubatoru (Galaxy 170s, Eppendorf, Hamburg, Germany) pri 37°C i 5% CO₂.

Sastav PBS pufera (1%):

8,0 g/L NaCl

0,2 g/L KCl

1,42 g/L Na₂HPO₄

0,24 g/L KH₂PO₄

pH 7,4

2.2. Priprema stanica za ekspanzijsku mikroskopiju

Cilj ovog rada bio je mehanički ekspanzirati (izotropno proširiti u svim smjerovima) diobena vretena u metafazi i prometafazi te ih snimiti konfokalnom mikroskopijom. Ekspandiranjem uzorka povećava se razmak između stanica u uzorku i to smanjuje vjerojatnost nalaženja diobenog vretena u ekspandiranom uzorku, a udio stanica u diobi je ionako mali i u neekspandiranom uzorku. U svrhu povećavanja broja prometafaznih i metafaznih diobenih vretena korišten je inhibitor RO-3306 (Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Inhibitor RO-3306 je CDK inhibitor (engl. *cyclin-dependent kinase*) što znači da inhibira ciklin ovisne kinaze te dovodi do blokiranja staničnog ciklusa na prijelazu iz G2 u M fazu. Nakon 24 sata od dodatka inhibitora RO-3306, medij se isisava, a stanice se ispiru tri puta s 1 mL sterilnog 1% PBS pufera. Nakon ispiranja dodaje se novi, topli DMEM hranjivi medij i stanice se vraćaju u inkubator na 37°C. Tada, sve stanice čiji je stanični ciklus do tada bio blokiran u G2/M prijelazu, sinkronizirano ulaze u staničnu diobu. Eksperimentiranjem s duljinom vremena stajanja stanica u inkubatoru, zaključeno je da je nakon 45 minuta od ispiranja inhibitora približno 40% stanica ušlo u diobu. Nakon toga stanice su spremne za fiksaciju i nastavak protokola za ekspanzijsku mikroskopiju. Takvom sinkronizacijom možemo dobiti obogaćenu populaciju stanica u prometafazi. Osim inhibitora RO-3306, korišten je i MG-132 inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) koncentracije 200 µl. Nakon ispiranja inhibitora RO i dodatka svježeg medija na stanice na 45 minuta, dodao se MG-132 inhibitor koji je onda ostao na stanicama 15-20 minuta, te su se nakon toga stanice fiksirale. MG-132 inhibitor zaustavlja staničnu diobu u metafazi, te se uz dodatak njega moglo upravljati u kojoj će fazi diobe biti fiksirane stanice, odnosno mogla se dobiti populacija obogaćena stanicama u metafazi.

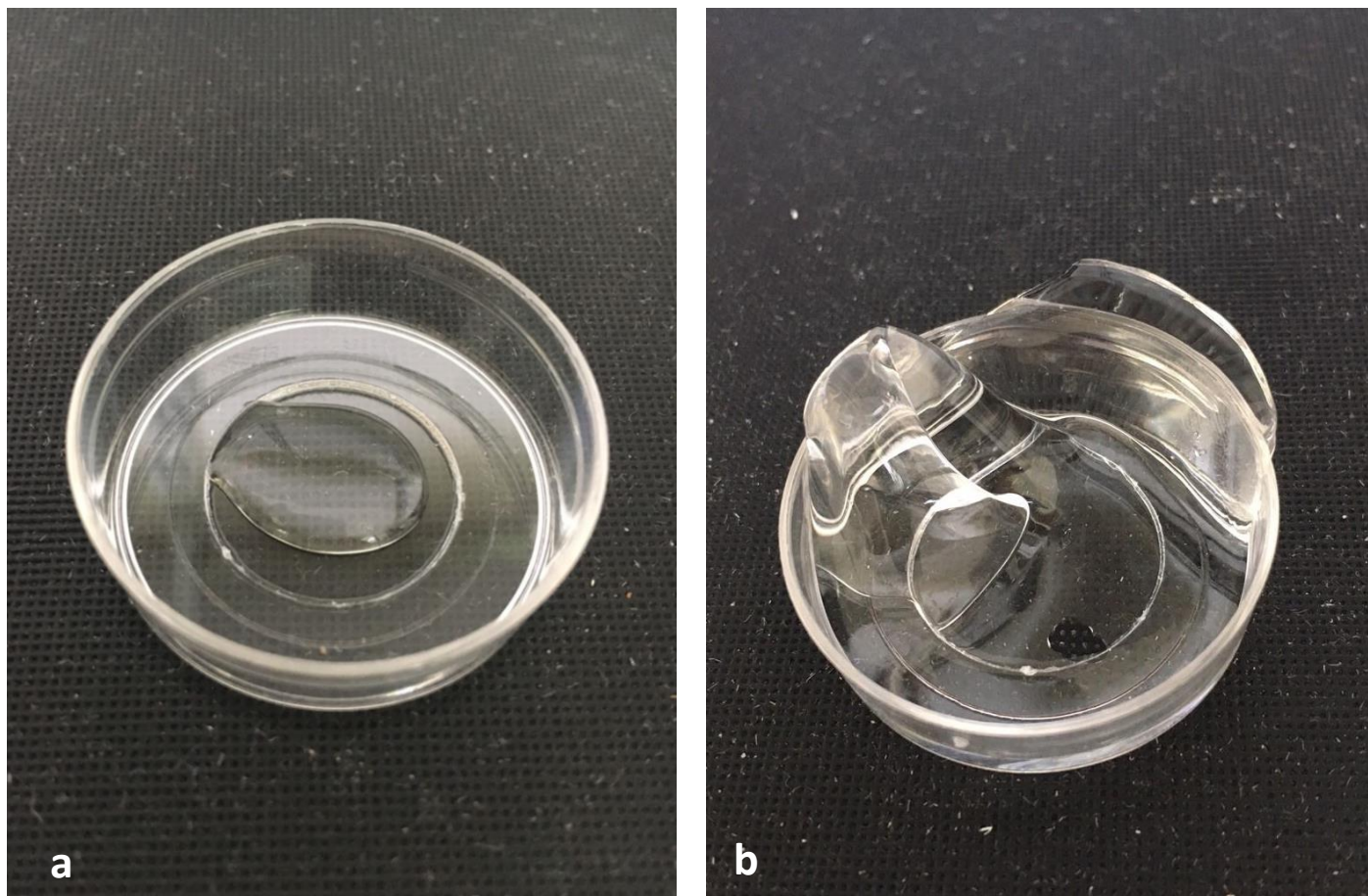
2.3. Protokol za ekspanzijsku mikroskopiju

U ovom diplomskom radu napisana je samo završna verzija protokola za ekspanzijsku mikroskopiju, a dobivanje ovog protokola, koji se može rutinski koristiti za efikasno ekspandiranje stanica, bio je jedan od ciljeva ovog diplomskog rada.

U ovom radu isprobano je 7 različitih načina fiksacije: fiksacija 4% paraformaldehidom u trajanju od 10 minuta, fiksacija PEM puferom 30 sekundi nakon kojega se dodala mješavina PEM-a, 0,1% glutaraldehida i 3,2% paraformaldehida na 10 minuta, fiksacija PEM puferom 1 sekundu nakon kojega se dodala mješavina PEM-a, 0,1% glutaraldehida i 3,2% paraformaldehida na 10 minuta, fiksacija mješavinom PEM pufera i 0,1% glutaraldehida na 20 minuta nakon koje se dodao 4% paraformaldehid na 5 minuta i nakon njega metanol na 3 minute na -20 °C, fiksacija mješavinom PEM pufera i 0,1% glutaraldehida na 20 minuta, fiksacija mješavinom PEM pufera i 3,2% paraformaldehida na 10 minuta te fiksacija 100% metanolom na 3 minute na -20 °C. Najuspješniji način fiksacije bio je PEM pufer na 1 sekundu te nakon njega mješavina fiksativa koja se sastoji od PEM pufera i 0,1 % glutaraldehida uz dodatak 3,2% paraformaldehida na 10 minuta.

Prethodno sinkronizirane stanice u posudi za mikroskopiranje, u svrhu permeabilizacije, ispuštanja sadržaja citoplazme, a očuvanja citoskeletnih struktura, isprane su 1 sekundu s PEM puferom (0,1 M PIPES pH 7, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0,5% Triton-X-100) te su nakon toga fiksirane fiksativom koji se sastoji od PEM pufera i 0,1 % glutaraldehida uz dodatak 3,2% paraformaldehida 10 minuta. Nakon toga stanice su kratko isprane u PBS puferu (1%) (*engl. Phosphate-buffered saline*) te nakon toga, na 5 minuta, dodana je 10 mM vodena otopina natrijeva borhidrida u svrhu redukcije glutaraldehida iz fiksativa budući da isti autofluorescira čime bi ometao snimanje. Nakon toga stanice su 3 puta oprane u PBS puferu po 5 minuta te je na njih dodan blokirajući/permeabilizirajući pufer (PBS s 1% NGS i 0,5% Triton X-100), kako bi dodatno permeabilizirao stanice i uklonili nespecifično vezanje antitijela na podlogu, na 30 minuta. Uzorci su onda inkubirani u primarnim antitijelima (alpha Tubulin Antibody MA1-80017 (Thermo Fisher) i Anti Hec1 (ab3613, Abcam)) u blokirajućem/permeabilizirajućem puferu preko noći. Sutradan uzorci su isprani 3 puta s PBS puferom po 5 minuta i nakon toga inkubirani u sekundarnom antitijelu (Alexa Fluor 488 conjugated donkey anti-rat antibody (Abcam) i Alexa Fluor 594 conjugated donkey anti-mouse antibody (Abcam)) 45 minuta. Nakon još tri ispiranja u PBS puferu, uzorku je bila dodana otopina boje SiR- DNA (Spirochrome) (20 minuta) ili otopina boje DAPI (30 minuta), a nakon toga uzorak se inkubirao u 0,25% glutaraldehydu na sobnoj temperaturi 10 minuta i opet isprao tri puta u PBS puferu. Nakon toga slijedilo je geliranje (**Slika 14.**). Na fiksirane stanice dodana je otopina monomera (1 × PBS, 2 M NaCl, 2,5% (wt/wt) akrilamid, 0,15% (wt/wt) N,N'-metilenbisakrilamid, 8,625% (wt/wt) natrijev akrilat), 0,2% otopina amonijeva persulfata, 0,2% otopina tetrametiletilendiamina i voda i stanice su se inkubirale na 37°C 30 minuta. Nakon geliranja, na gel je bio dodan digestijski pufer (50 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-

100, 0,8 M guanidin HCl uz dodanu Proteinazu K) te ostavljen da se inkubira preko noći. Sutradan se gel, koji se već odvojio od podloge i upio vodu iz digestijskog pufera, expandirao. Gel se expandirao tako da se ispirao s ReH_2O 4 puta po 30 minuta. Nakon toga ili umjesto zadnjeg ispiranja vodom, opet je dodana otopina boje DAPI na 30 minuta. Uzorak u gelu se nakon toga promatrao na mikroskopu.



Slika 14. Fotografije gela (otopina monomera (1 × PBS, 2 M NaCl, 2,5% (wt/wt) akrilamid, 0,15% (wt/wt) N,N'-metilenbisakrilamid, 8,625% (wt/wt) natrijev akrilat), 0,2% otopina amonijeva persulfata, 0,2% otopina tetrametiletilendiamina i voda) prije i nakon ekspanzije. (a) Gel nakon 30 minuta na 37°C, prije dodatka digestijskog pufera i ekspanziranja vodom. (b) Gel nakon dodatka digestijskog pufera i ekspanziranja vodom 4 puta po 30 minuta. Tako ekspanziran gel u kojem se nalaze i ekspanzirane stanice, promatra se mikroskopom.

2.4. Mikroskopiranje

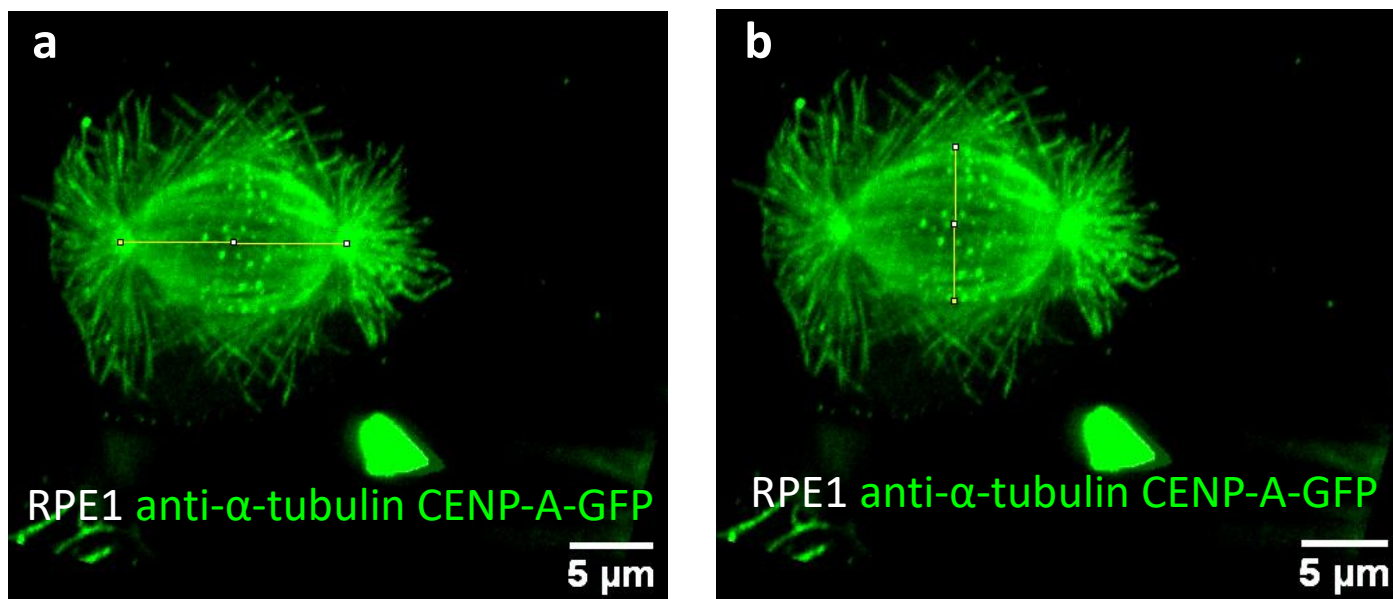
Stanice su snimane s Bruker Opterra Multipoint Scanning konfokalnim mikroskopom (Bruker Nano Surfaces, Middleton, WI, USA). Sustav je postavljen na Nikonov preokretni Ti-E mikroskop opremljen Nikonovim CFI Plan Apo VC $\times 100 / 1,4$ uljnim objektivom (Nikon, Tokyo, Japan). Tijekom snimanja stanice su bile na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u Okolab Cage inkubatoru (Okolab, Pozzuoli, NA, Italy). Karakteristika laserskog pretražnog konfokalnog mikroskopa je točkasta izlazna apertura (engl. pinhole). Slike su uhvaćene s Evolve 512 Delta EMCCD kamerom (Photometrics, Tucson, AZ, USA). Sustav je kontroliran s Prairie View Imaging Software (Bruker Nano Surfaces, Middleton, WI, USA). S obzirom na izbor sekundarnih antitijela i DAPI otopinu boje za označavanje DNA, odabrane su pobudne laserske linije valnih duljina 488 nm, 561 nm i 405 nm. Za dio eksperimenta u kojem su se snimala ekspanzirana diobena vretena je prilikom svakog snimanja odabrano između 30 i 100 Z-ravnina koje prekrivaju cijelo diobeno vreteno. Za snimanje neekspanziranih diobenih vretena je prilikom svakog snimanja odabrano između 15 i 30 Z-ravnina koje prekrivaju cijelo diobeno vreteno, a razmak između dvije susjedne ravnine iznosio je $0,5\text{ }\mu\text{m}$. Duljina snimanja svakog diobenog vretena se razlikovala.

2.5. Analiza snimaka

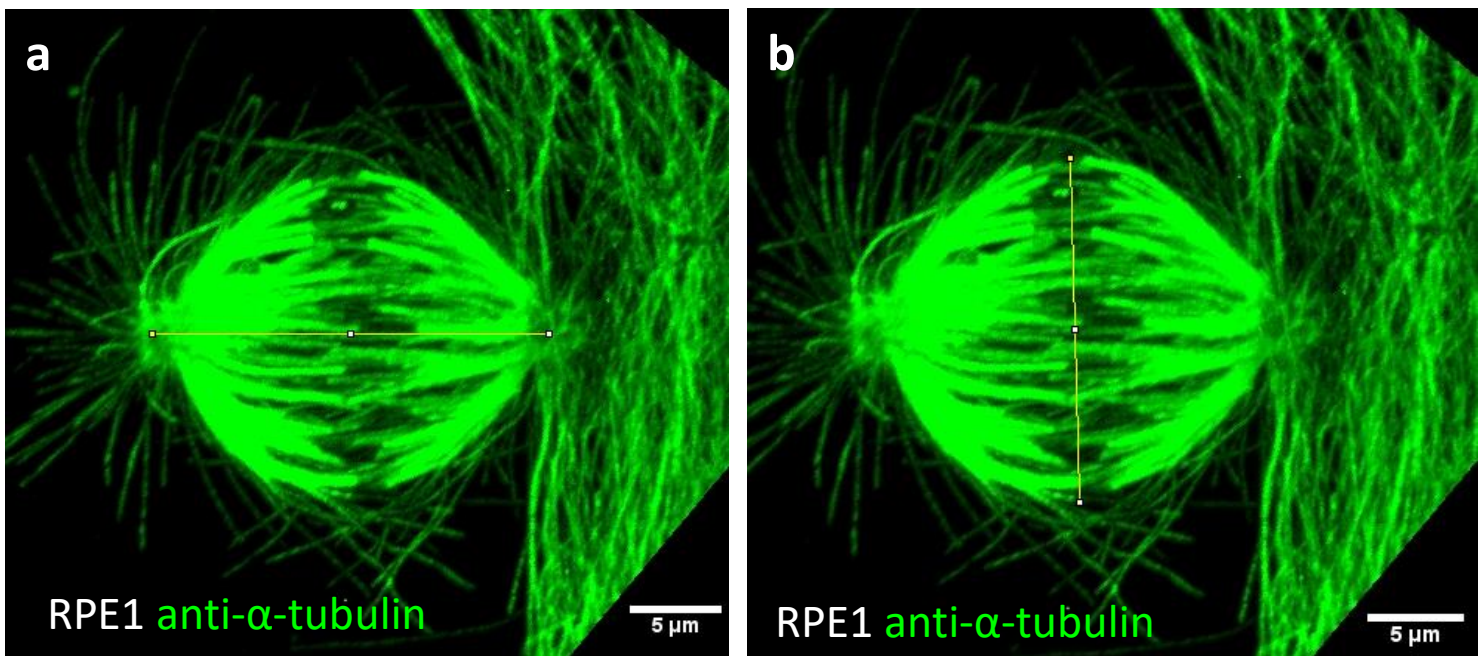
2.5.1. Mjerenje duljine i širine diobenog vretena

Za analizu i procesiranje mikroskopskih snimaka korišten je ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, SAD). ImageJ je javno dostupan program koji se temelji na programskom jeziku Java (Oracle Corporation, Redwood, SAD) što omogućuje korištenje programa na svim operativnim sustavima. Program sadrži traku izbornika (engl. *menu bar*), alatnu traku (engl. *tool bar*), traku pozicije (engl. *status bar*) i traku napretka (engl. *progress bar*). Alatna traka sadrži razne opcije za obradu slike, kao što su alat za promjenu boje, približavanje i udaljavanje, pomicanje i označavanje slike. Kako bi se odredile duljine i širine pojedinih dijelova diobenog vretena, koriste se alati linija. Tako se može koristiti ravna linija (engl. *straight line*), segmentirana linija (engl. *segmented line*) i rukom iscrtana krivulja (engl. *freehand line*). Traka pozicije u svakom trenutku pokazuje koordinate nacrtane linije i duljinu objekta koji mjerimo. Ravnom

linijom mjerene su duljine i širine diobenih vretena. Duljina svakog diobenog vretena mjerena je kao udaljenost između centrosoma, tako da linija započinje i završava u središtu svakog od centrosoma, kao što je prikazano na **slici 15. a**. Širina je mjerena kao udaljenost između vanjskih, najudaljenijih snopova kinetohornih mikrotubula, kao što je prikazano na **slici 15. b**. Duljine ekspanziranih i neekspanziranih diobenih vretena mjerene su na isti način što je prikazano na **slikama 16. a i 16. b**.



Slika 15. Mjerenje duljine i širine diobenog vretena prije ekspanzije. (a) Snimka RPE1 stanice, koja stabilno eksprimira centromerni protein A obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (CENP-A-GFP) (zelene točke) te je obilježena antitijelom protiv tubulina (zeleno), prije ekspanzije. Prikazano je kako se u programu ImageJ, alatom linije, izmjerila duljina diobenog vretena. (b) Ista RPE1 stanica, na kojoj je prikazano kako se alatom linije u ImageJ programu izmjerila širina diobenog vretena. Mikrotubuli i kinetohore (točke) prikazani su zelenom bojom. Prikazana je maksimalna projekcija svih Z-ravnina. Skala = 5 µm.

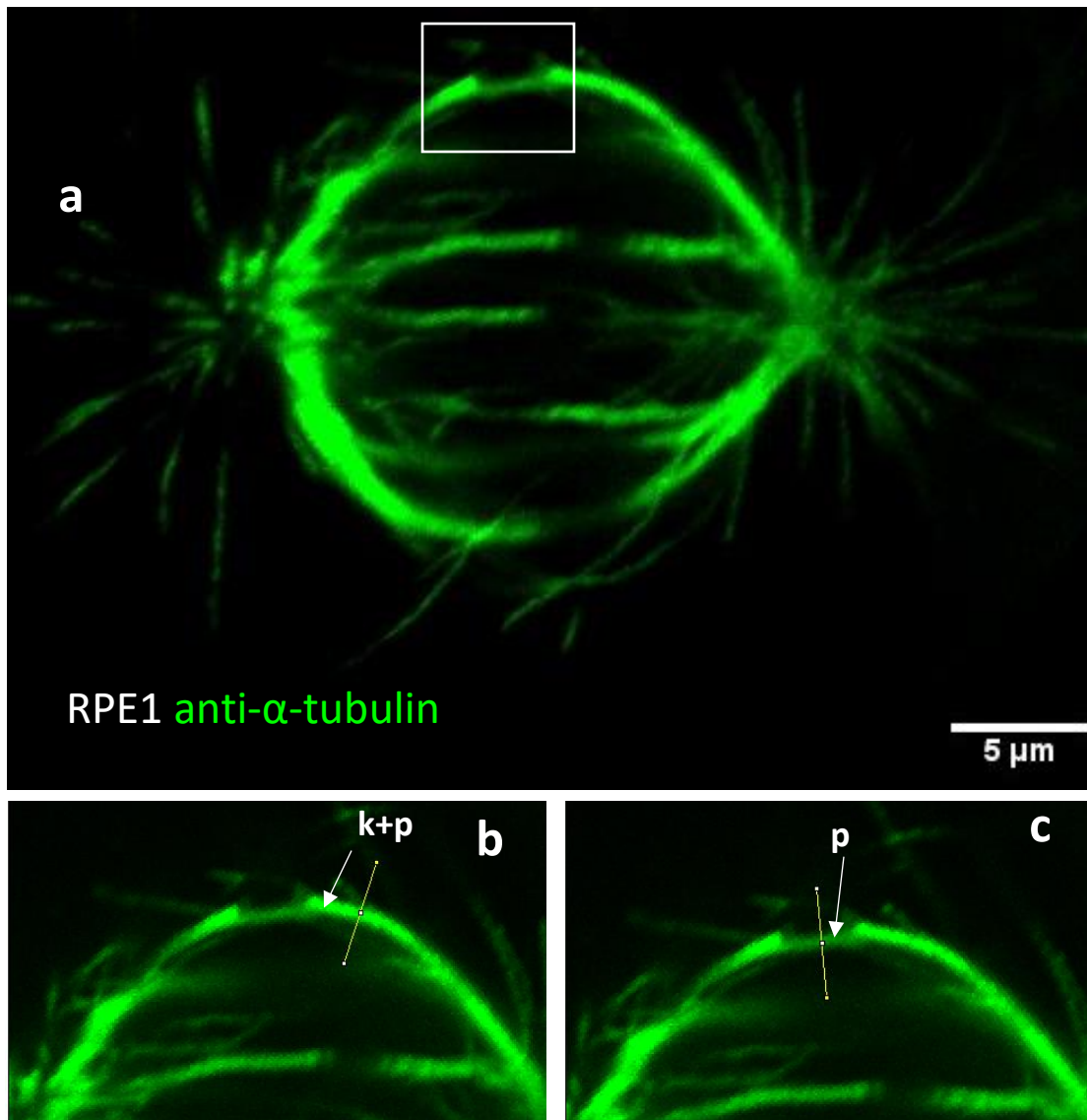


Slika 16. Mjerenje duljine i širine diobenog vretena nakon ekspanzije. (a) Snimka ekspanziranog diobenog vretena iz RPE1 stanice koja je obilježena antitijelom protiv tubulina (zeleno). Alatom linije u programu ImageJ izmjerena je duljina diobenog vretena. (b) Ista stanica iz slike (a) ali s prikazom načina na koji su mjerene širine ekspanziranih diobenih vretena. Mikrotubuli su prikazani zelenom bojom. Prikazana je maksimalna projekcija svih Z-ravnina. Skala = 5 μm .

2.5.2. Analiza intenziteta signala fluorescencije premosnih i kinetohornih vlakana u diobenom vretenu

Korištenjem signala intenziteta premosnog vlakna i kinetohornog vlakna odredio se relativni broj mikrotubula u ova dva snopa. Signal intenziteta mikrotubula između dvije sestrinske kinetohore nazvan je I_b , a signal kinetohornog vlakna, mjeren u blizini kinetohore, nazvan je I_{bk} . Signali intenziteta nisu znatno varirali između različitih slika. Signal intenziteta I_b se interpretira kao signal premosnog vlakna, a I_{bk} kao sumu signala kinetohornog vlakna i signala premosnog vlakna, I_{k+I_b} . Omjer I_b/I_{bk} je izračunat i konstantan je u svim mjerenjima. Iz tog omjera može se procijeniti da premosno vlakno sadrži $I_b/I_k = (I_b/I_{bk}) / (1 - I_b/I_{bk})$ od broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu čiji je broj poznat od ranije, iz literature.

Za analizu intenziteta signala fluorescencije premosnih i kinetohornih vlakana u diobenom vretenu uz ImageJ korišten je i računalni program SciDAVis. SciDAVis (Scientific Data Analysis and Visualization) je besplatni, javni program za dvodimenzionalnu i trodimenzionalnu grafičku prezentaciju setova podataka i za analizu podataka. Za analizu intenziteta signala fluorescencije premosnih i kinetohornih vlakana najprije je bilo potrebno uz pomoć slike u ImageJ programu, kretanjem se po Z-ravninama, vizualizirati premosna vlakna u diobenom vretenu i zbog ljepšeg prikaza istog, izdvojiti nekoliko Z-ravnina u kojima se to premosno vlakno najbolje vidi. Nakon što se dobije slika u kojoj se premosno vlakno jasno vidi kao na **slici 17. a**, premosno vlakno se približi pomoću alata za približavanje i uz pomoć alata ravne linije ImageJ programa, povlači se linija okomita na premosno vlakno kao što se vidi na **slici 17. b**, koja je za svako premosno vlakno jednako duga, u ovom slučaju 4 mikrometra. Nakon toga u programu ImageJ pritiskom na tipku k dobije se profil intenziteta. Profil intenziteta prikazuje dvodimenzionalni graf intenziteta piksela duž povučene linije. X-os predstavlja udaljenost duž linije, a y-os je intenzitet signala piksela. Pritiskom na opciju List možemo vidjeti i spremiti brojčane podatke odnosno koordinate grafa intenziteta. Dobivene vrijednosti x- i y-osi grafa se nakon toga prebacuju u tablicu (engl. *table*) u program SciDAVis, obilježe se te se pritiskom na opciju Plot (Line) dobiva dvodimenzionalni grafički prikaz nalik profilu intenziteta dobivenom u ImageJ. Pomoću grafičkog prikaza dobivenom u SciDAVis-u, koristeći brojčanu integraciju grafa linearnom interpolacijom, dobivamo maksimalne vrijednosti na x-osi i y-osi, te dobivamo vrijednost površine ispod maksimalne vrijednosti (engl. *peak*) x-osi koju uzimamo za vrijednost intenziteta signala fluorescencije premosnog vlakna. Intenzitet se računao na baznoj liniji površine ispod maksimalne vrijednosti (engl. *peak*). U računu se oduzima vrijednost pozadine (engl. *background*) od ukupnog intenziteta kako bi se dobile vrijednosti koje točno odgovaraju površini na grafu ispod maksimalne vrijednosti. Na identičan način došlo se i do vrijednosti intenziteta signala fluorescencije kinetohornog vlakna. Nakon što se izdvojilo nekoliko Z-ravnina u kojem je premosno vlakno najbolje vidljivo, alatom ravne linije povlači se linija okomita na kinetohorno vlakno koje se nalazi s lijeve ili desne strane premosnog vlakna, kao što je prikazano na **slici 17. c**. Daljnji koraci isti su kao i za premosno vlakno.

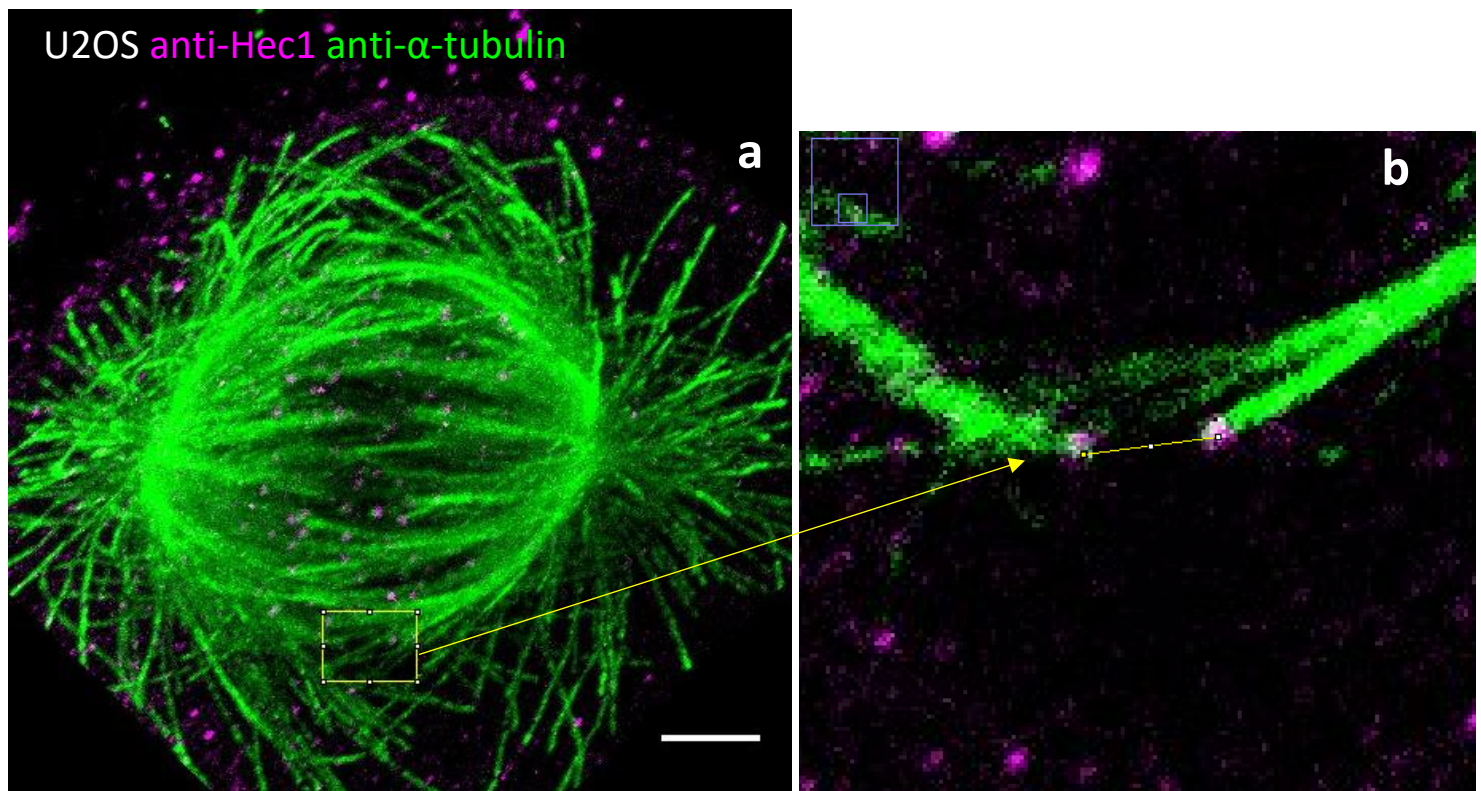


Slika 17. **Analiza intenziteta signala fluorescencije premosnih i kinetohornih vlakana.** (a) Slika diobenog vretena RPE1 stanice koja je obilježena antitijelom protiv tubulina (zeleno), dobivena u programu ImageJ odabirom maksimalne projekcije samo 2 Z-ravnine, u kojima se jasno vidi premosno vlakno u gornjem, vanjskom snopu mikrotubula koje se nalazi u pravokutniku. Premosno vlakno prikazano na ovaj način omogućava mjerenje intenziteta signala fluorescencije jer nema pozadinskih mikrotubula koji bi smetali pri mjerenju intenziteta kao u maksimalnoj projekciji svih Z-ravnina. (b) Uvećani dio slike a, koji pokazuje kako je na kinetohorno vlakno (k+p) okomito povučena linija uz pomoć alata ravne linije kojom će se dobiti profil intenziteta signala fluorescencije kinetohornog vlakna. (c) Uvećani dio slike a koji prikazuje

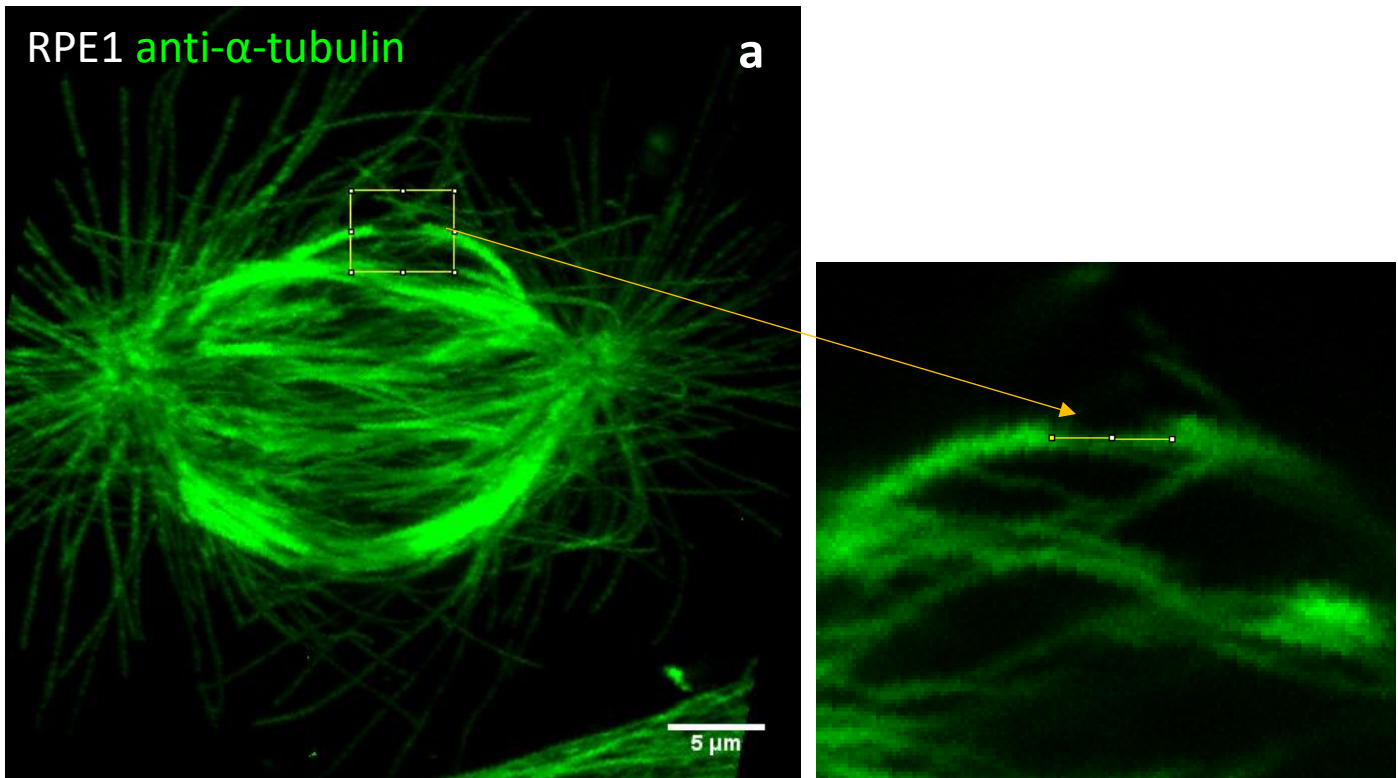
kako je na premosno vlakno (p) okomito povučena linija uz pomoć alata ravne linije, kojom će se dobiti profil intenziteta signala fluorescencije premosnog vlakna. Skala = 5 μm .

2.5.3. Mjerenje udaljenosti između sestrinskih kinetohora

Za mjerenje udaljenosti između sestrinskih kinetohora korišten je računalni program ImageJ, a udaljenost se mjerila uz pomoć alata linije. Na snimkama vretena (**Slike 18. i 19.**) koji su imala vidljive kinetohore, udaljenost se mjerila kao udaljenost od središta jedne sestrinske kinetohore do središta druge sestrinske kinetohore kao što je vidljivo na **slici 18. b**. Većina snimaka diobenih vretena nije imala vidljive kinetohore pa su rubovi kinetohornih vlakana, s obje strane premosnog vlakna, poslužili kao početna i završna točka linije kojom se mjerila udaljenost između sestrinskih kinetohora što je vidljivo na **slici 19. b**.



Slika 18. **Mjerenje udaljenosti između sestrinskih kinetohora.** (a) Maksimalna projekcija svih z-ravnina snimke ekspanzirane U2OS stanice obilježene antitijelom protiv α -tubulina (zeleno) i antitijelom protiv Hec1 (ružičasto). U takvoj se stanici udaljenost kinetohora mogla mjeriti od jedne do druge kinetohore. (b) Snimka samo 2 z-ravnine slike a, u kojima se jasno vide kinetohore. Na slici je prikazano kako se alatom linije u programu ImageJ mjerila udaljenost između sestrinskih kinetohora. Skala = 5 μ m.



Slika 19. **Mjerenje udaljenosti između sestrinskih kinetohornih vlakana.** (a) Maksimalna projekcija svih z-ravnina snimke ekspanzirane RPE1 stanice obilježene antitijelom protiv α -tubulina. U takvoj se stanici udaljenost kinetohora morala mjeriti od jednog do drugog kraja kinetohornog vlakna, jer kinetohore nisu bile vidljive, kao što je prikazano na slici (b). (b) Snimka samo 2 z-ravnine slike a, u kojima se vide sestrinska kinetohorna vlakna te premosno vlakno. Na slici je prikazano kako se alatom linije u programu ImageJ mjerila udaljenost između sestrinskih kinetohora. Skala = 5 μm .

2.5.4. Transformacija orijentacije diobenih vretena

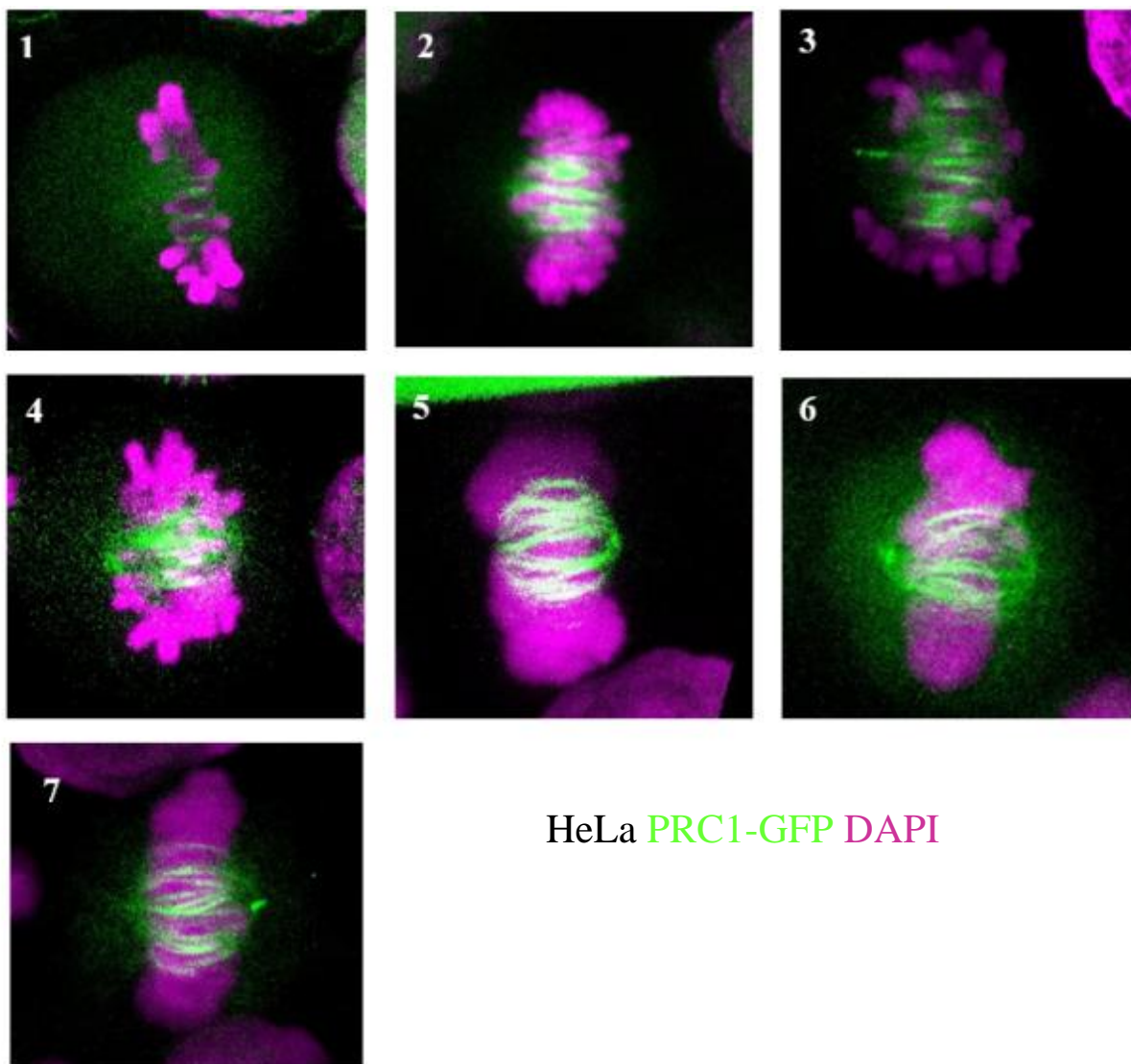
Mikroskopske slike su analizirane i uređene u ImageJ programu. Dobiveni podaci su radi transformacije vertikalno orijentiranog diobenog vretena u horizontalno, te obrnuto, dalje analizirani u R programskom jeziku. Da se osigura da je vreteno maksimalno vertikalno nakon transformacije, horizontalno vreteno je izabrano za transformaciju samo ako su se oba pola vretena mogla vidjeti istovremeno u istoj slici. Zbog istog razloga, prije transformacije, slike su rotirane tako da duža os vretena bude otprilike paralelna s x-osi. Analogno, slika vertikalno orijentiranog vretena je transformirana u horizontalno vreteno. Metoda je preuzeta iz članka Novak i suradnika (2017).

3. REZULTATI

3.1. Izbor fiksativa za ekspanzijsku mikroskopiju



Za vizualiziranje mikrotubula, kinetohora i DNA u diobenom vretenu u netumorskim RPE1 i tumorskim U2OS stanicama, fiksacija je bila najuspješnija s mješavinom 3,2% paraformaldehida i 0,1% glutaraldehida u PEM puferu na stanicama koje su prethodno na 1 sekundu isprane samim PEM puferom. Tim načinom fiksacije također su ostali dobro vidljivi astralni mikrotubuli te se diobeno vreteno nije smanjilo u odnosu na prosječnu duljinu diobenog vretena koja je $11,1 \pm 1 \mu\text{m}$ (srednja vrijednost + stand. dev. uvijek, osim ako nije posebno naznačeno). Ljudska tumorska stanična linija HeLa-Kyoto BAC koja stabilno eksprimira protein PRC1 obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (PRC1-GFP) korištena je za provjeru utjecaja fiksacije na vidljivost proteina PRC1-GFP, te isto kao i kod RPE1 i U2OS staničnih linija, mogao se vidjeti utjecaj fiksativa na duljinu diobenog vretena te vidljivost DNA. Fiksacija s mješavinom 3,2% paraformaldehida i 0,1% glutaraldehida u PEM puferu na stanicama koje su prethodno na 1 sekundu isprane samim PEM puferom bila je najuspješnija i za HeLa staničnu liniju koja stabilno eksprimira protein PRC1-GFP (**Slika 20., 3**). Fiksacijom s 4% paraformaldehydom u staničnim linijama RPE1 i U2OS, dobro je bila vidljiva DNA i mikrotubuli, ali je došlo do smanjenja diobenog vretena ($9,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$), a kinetohore, kao ni astralni mikrotubuli, nisu bile vidljive. Nakon iste fiksacije HeLa stanica koje stabilno ekspimiraju protein PRC1-GFP, protein PRC1-GFP nije bio vidljiv (**Slika 20., 1**). Fiksacijom s PEM puferom na 30 sekundi te nakon toga mješavinom fiksativa 0,1% glutaraldehida i 3,2% paraformaldehida u PEM-u u staničnim linijama RPE1 i U2OS, dobro je bila vidljiva DNA i mikrotubuli, ali kinetohore nisu bile vidljive te su se vretena smanjila fiksacijom u odnosu na vretena u živim stanicama ($9 \pm 1 \mu\text{m}$) (**Slika 21. a**). Nakon iste fiksacije HeLa stanica koje stabilno ekspimiraju protein PRC1-GFP, protein PRC1-GFP je bio vidljiv (**Slika 20., 2**) Fiksacijom s mješavinom PEM pufera i 0,1% glutaraldehida te nakon toga dodatka 4% paraformaldehida i nakon njega 100% metanola u staničnim linijama RPE1 i U2OS, dobro je bila vidljiva DNA, mikrotubuli uključujući i astralne, nije došlo do smanjenja vretena nakon fiksacije ($11,1 \pm 1 \mu\text{m}$), ali kinetohore nisu bile vidljive (**Slika 21. b**). Nakon iste fiksacije HeLa stanica koje stabilno ekspimiraju protein PRC1-GFP, protein PRC1-GFP je bio vidljiv (**Slika 20., 2**). Fiksacijom s mješavinom PEM pufera i 0,1% glutaraldehida u staničnim linijama RPE1 i U2OS, dobro je bila vidljiva DNA, mikrotubuli uključujući i astralne, nije došlo











































do smanjenja diobenih vretena ($11.1 \pm 1 \mu\text{m}$) ali kinetohore nisu bile vidljive ili su bile vidljive jako slabo. Nakon iste fiksacije HeLa stanica koje stabilno eksprimiraju protein PRC1-GFP, protein PRC1-GFP je bio vidljiv (**slika 20., 6**). Fiksacijom s mješavinom PEM pufera i 3,2% paraformaldehida u staničnim linijama RPE1 i U2OS, dobro je bila vidljiva DNA, mikrotubuli uključujući i astralne, ali je došlo do smanjenja diobenih vretena u odnosu na žive stanice ($9,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$) i kinetohore nisu bile vidljive. Nakon iste fiksacije HeLa stanica koje stabilno eksprimiraju protein PRC1-GFP, protein PRC1-GFP je bio vidljiv (**Slika 20., 5**). Fiksacijom 100% metanolom, 3 minute na -20°C , u staničnim linijama RPE1 i U2OS, dobro je bila vidljiva DNA, mikrotubuli i kinetohore, ali astralni mikrotubuli nisu bili vidljivi te je došlo do smanjenja diobenih vretena u odnosu na žive stanice ($9,8 \pm 1 \mu\text{m}$). Nakon iste fiksacije HeLa stanica koje stabilno eksprimiraju protein PRC1-GFP, protein PRC1-GFP je bio vidljiv (**Slika 20., 7**). U **tablici 1.** prikazani su rezultati za svih 7 korištenih načina fiksacija čija se učinkovitost mjerila prema prethodno navedenim parametrima.

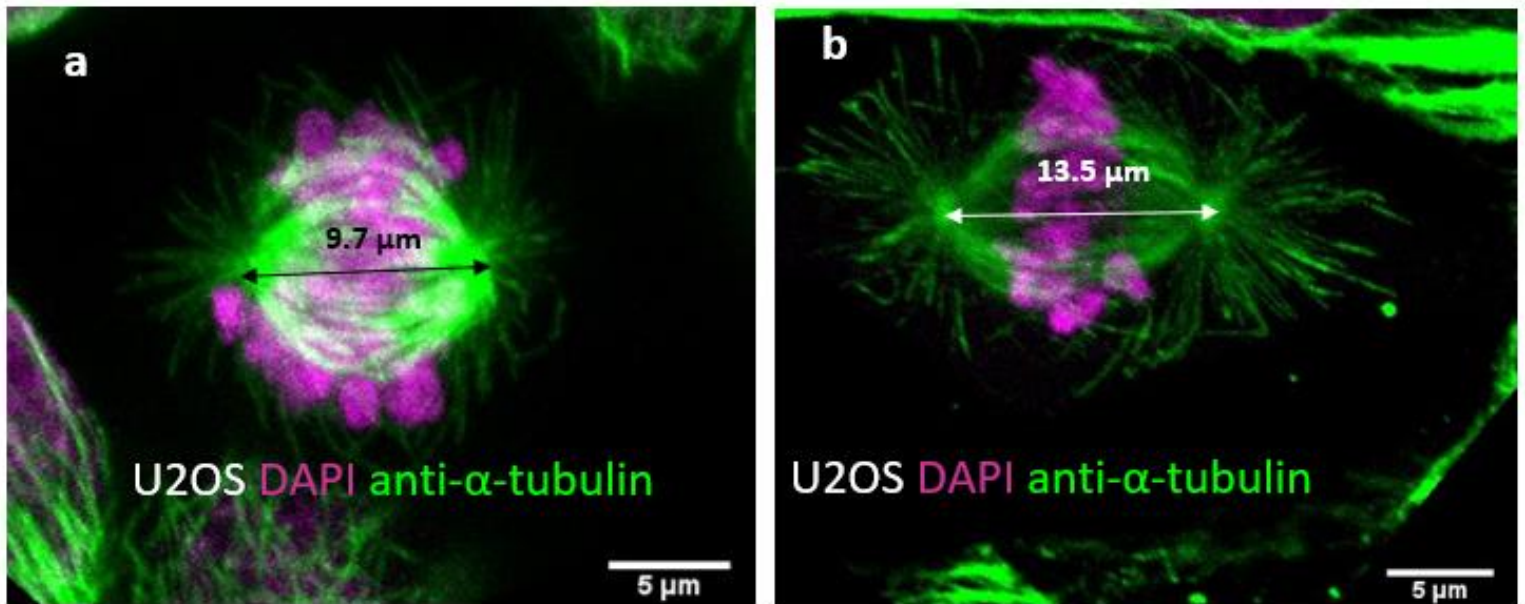


HeLa PRC1-GFP DAPI

Slika 20. Usporedba 7 načina fiksacije na ljudskoj tumorskoj staničnoj liniji HeLa-Kyoto BAC koja stabilno eksprimira protein PRC1 obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (PRC1-GFP) te je obilježena DAPI bojom za DNA (ružičasto). Na snimkama je vidljiv utjecaj pojedine fiksacije na duljinu diobenog vretena, vizualizaciju DNA te proteina PRC1-GFP u HeLa staničnoj liniji. **1** - 4% paraformaldehid (PRC1-GFP nije vidljiv), **2** - PEM(30s) + (0,1% glutaraldehid+ 3,2% paraformaldehid), **3** - PEM(1s) + (0,1% glutaraldehid + 3,2% paraformaldehid), **4** - (PEM + 0,1% glutaraldehid) + 4% paraformaldehid + 100% metanol, **5** – PEM + 3,2% paraformaldehid, **6** – PEM + 0,1% glutaraldehid, **7** - 100% metanol. Skala = 5 μ m.

Tablica 1. Usporedba 7 načina fiksacije isprobanih u ovom radu prema kriterijima koji su bili bitni za vizualiziranje cijelog diobenog vretena pomoću ekspanzijske mikroskopije. Znak plus () stavljen je ako je način fiksacije pogodan za navedeni parametar, a znak minus () ako način fiksacije nije pogodan za navedeni parametar. Fiksativi su testirani na U2OS, RPE1 te HeLa staničnim linijama.

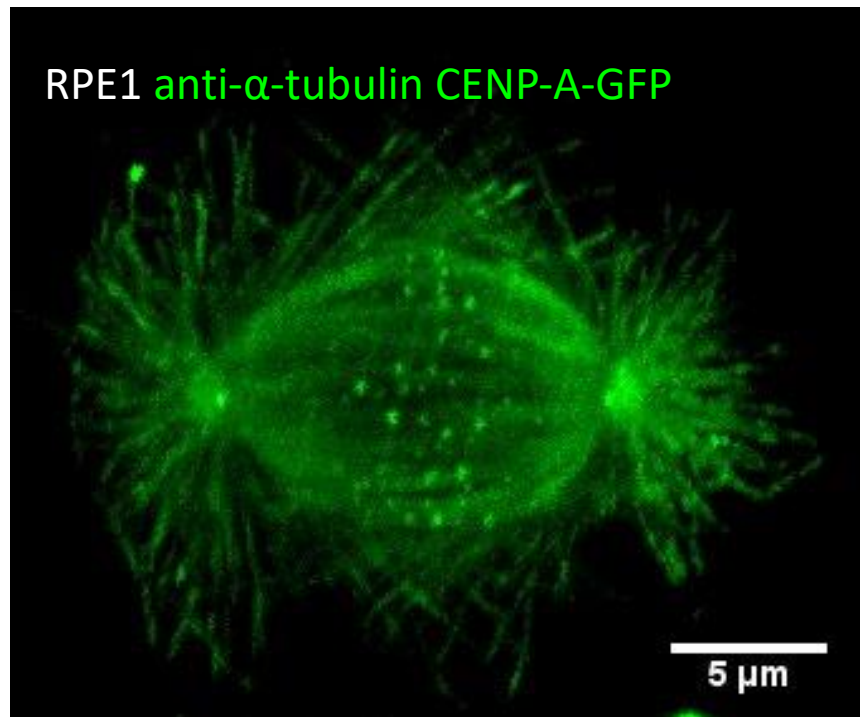
FIKSACIJA	Otopina boje DAPI (za označavanje DNA)	Primarno antitijelo za tubulin (alpha Tubulin Antibody MA1-80017)	Primarno antitijelo za kinetohore (Anti Hec1)	Vidljivost astralni mikrotubuli	Diobeno vreteno sačuvalo duljinu	Protein PRC1-GFP kojeg HeLa stanica stabilno ekspirira
4% paraformaldehid						
PEM(30s)+ (0,1% glutaraldehid+ 3,2% paraformaldehid)						
PEM(1s) +(0,1% glutaraldehid +3,2% paraformaldehid)						
(PEM+0,1% glutaraldehid) +%4 paraformaldehid +100% metanol						
PEM +0,1% glutaraldehid						
PEM +3,2% paraformaldehid						
100% metanol						



Slika 21. Prikaz rezultata različitih načina fiksacije na U2OS stanicama obilježenim antitijelom protiv α -tubulina (zeleno) i DAPI bojom za DNA (ružičasto), prije ekspanzije. (a) Diobeno vreteno U2OS stanice koja je fiksirana s PEM puferom na 30 sekundi te nakon toga mješavinom fiksativa 0,1% glutaraldehida i 3,2% paraformaldehida u PEM-u. Kinetohore su bile obilježene antitijelom protiv kinetohornog proteina Hec1, ali nakon fiksacije nisu vidljive, te je vreteno smanjeno u odnosu na živu stanicu i njegova duljina iznosi 9.7 μm . Slični rezultati dobiju se i fiksacijom s mješavinom PEM pufera i 3,2% paraformaldehida. (b) Diobeno vreteno U2OS stanice koja je fiksirana s mješavinom PEM pufera i 0,1% glutaraldehida te nakon toga 4%-tnim paraformaldehydom i nakon toga 100%-tnim metanolom. Kinetohore su bile obilježene antitijelom protiv kinetohornog proteina Hec1, ali nakon fiksacije nisu vidljive, a vreteno je ostalo iste duljine kao i prije fiksacije i njegova duljina iznosi 13,5 μm . Slični rezultati dobiju se i fiksacijom s mješavinom PEM pufera i 0,1% glutaraldehida. Skala = 5 μm .

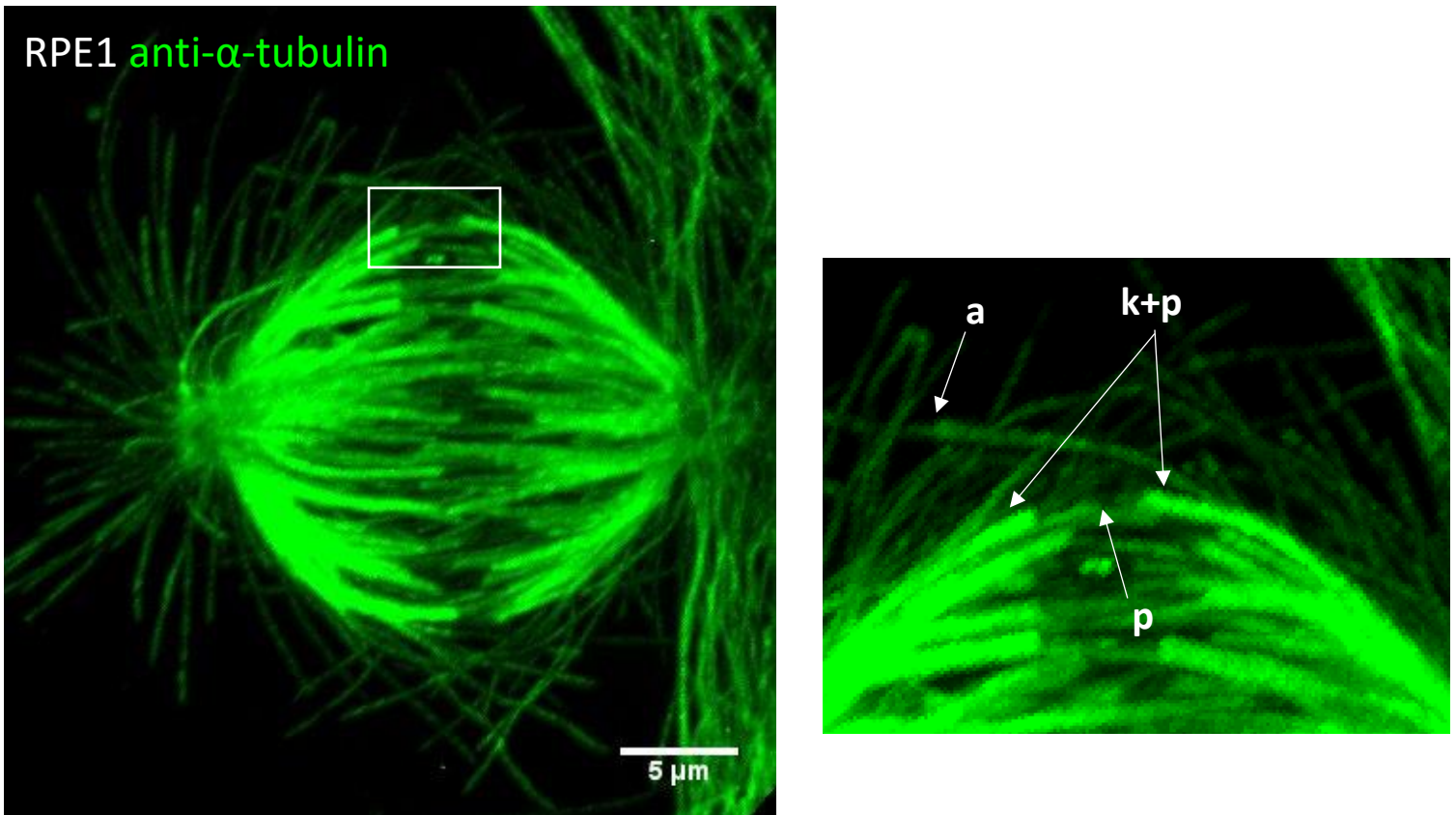
3.2. Duljine i širine prometafaznih i metafaznih vretena prije i poslije ekspanzijske mikroskopije

Prometafazna diobena vretena kao i metafazna diobena vretena, prepoznata su prema obliku i položaju kinetohora i kromosoma. Za diobena vretena prije ekspanzije snimano je od 15 do 30 Z-ravnina, a nakon ekspanzije od 30 do 100 Z-ravnina s razmakom između ravnina 0,5 μm . Na **slici 22.** prikazano je diobeno vreteno prije ekspanzije.

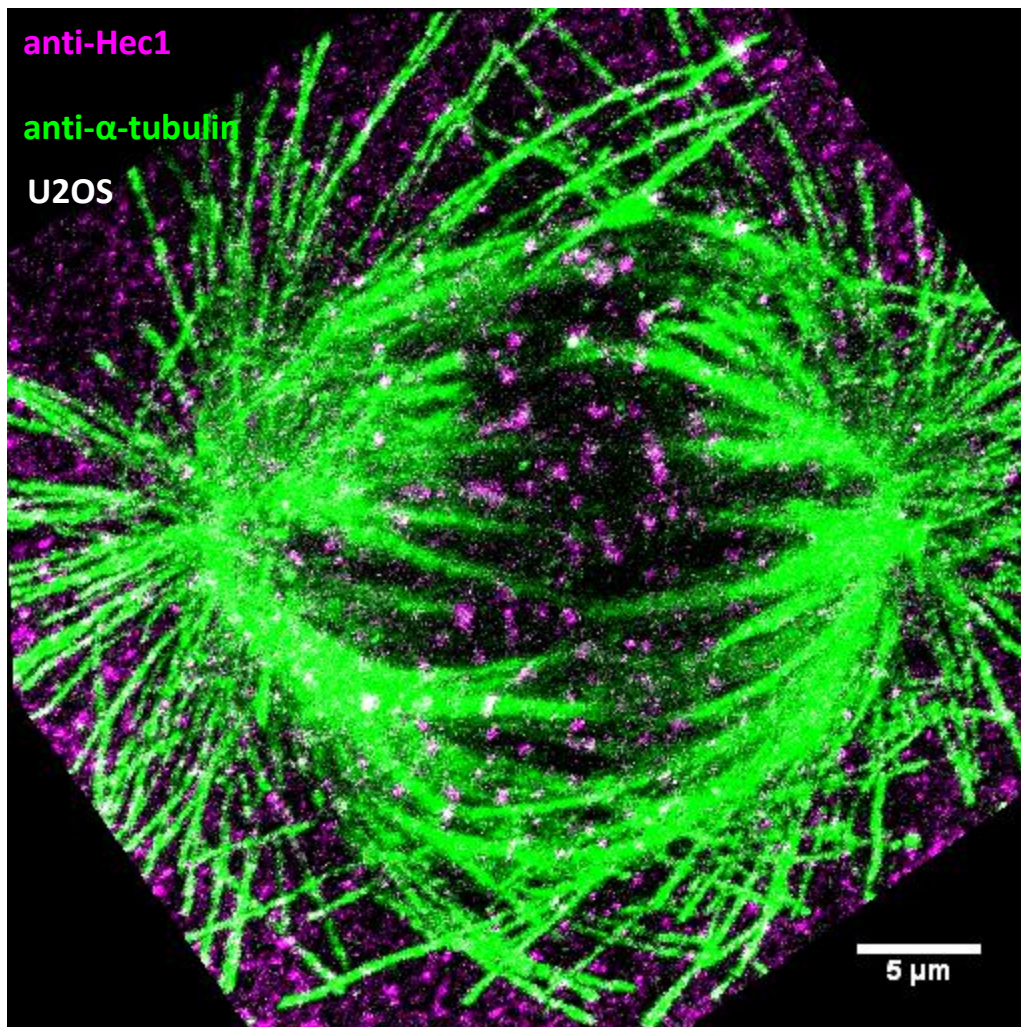


Slika 22. **Maksimalna projekcija svih z-ravnina diobenog vretena RPE1 stanice koje stanice stabilno eksprimiraju centromerni protein A obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (CENP-A-GFP) (zelene točke) te su obilježene antitijelom protiv tubulina (zeleno), prije ekspanzije.** Diobeno vreteno je snimljeno nakon dodatka sekundarnog antitijela, prije dodatka gela i ekspanzije. Mikrotubuli su prikazani zelenom bojom, kinetohore (točke) su prikazane zelenom bojom. Skala = 5 μm .

Na slikama 22. i 23. prikazana su diobena vretena nakon ekspanzije. Rezultati su pokazali da jakost i kvaliteta signala ovise o faktoru ekspanzije. Izmjereni su prosječni intenziteti signala fluorescencije na vretenu sa slike 23. te on iznosi 7901,2, dok prosjek intenziteta signala fluorescencije vretena sa slike 24. iznosi 1027,1, što je skoro 8 puta manje. Najbolje snimke vretena su one u kojima je faktor ekspanzije otprilike 2. Na slici 23. prikazano je diobeno vreteno duljine 21,85 mikrometara, a na slici 24. prikazano je diobeno vreteno duljine 31,4 mikrometra radi usporedbe kvalitete signala.



Slika 23. **Maksimalna projekcija svihi z-ravnina ekspandirane RPE1 stanice obilježene antitijelom protiv α -tubulina.** (a) Snimka diobenog vretena duljine 21,85 mikrometara, jasno se vide i kinetohorna i premosna vlakna, te astralni mikrotubuli. Mikrotubuli su prikazani zelenom bojom. (b) Uvećani dio slike (a), na kojem su označeni k+p – kinetohorno i premosno vlakno, p – premosno vlakno, a – astralni mikrotubuli. Skala = 5 μ m.



Slika 24. **Maksimalna projekcija svih z-ravnina ekspanzirane U2OS stanice obilježene antitijelom protiv α -tubulina (zeleno) i antitijelom protiv Hec1 (ružičasto) .** Snimka diobenog vretena duljine 31,4 mikrometara, koje ima slabiji signal fluorescencije mikrotubula u odnosu na sliku 23. te se kinetohorna i premosna vlakna ne vide jasno. Primarno antitijelo protiv kinetohornog proteina Hec1 (ružičasto) vezalo se nespecifično pa se ružičaste točke vidi po cijeloj snimci. Skala = 5 μ m.

Mjerenje je izvršeno na 20 stanica prije ekspanzije od kojih je 7 stanica iz netumorske RPE1 stanične linije, a 11 stanica iz tumorske U2OS stanične linije, te na 65 stanica nakon ekspanzije od kojih je 59 stanica iz RPE1 stanične linije, a 6 stanica iz U2OS stanične linije. Prosječna duljina diobenog vretena prije ekspanzije je $11,14 \pm 1 \mu\text{m}$ (**Tablica 2.**), a prosječna širina diobenog vretena prije ekspanzije je $8,67 \pm 1 \mu\text{m}$ (**Tablica 2.**). U **tablici 2.** prikazane su prosječne vrijednosti duljina i širina diobenih vretena prije i nakon ekspanzije. Faktor ekspanzije računao se kao omjer duljine ekspanziranog diobenog vretena i duljine neekspanziranog diobenog vretena, kao i omjer širine ekspanziranog i neekspanziranog diobenog vretena. I jedan i drugi omjer su isti i iznose $2,5 \pm 0,8$ (**Tablica 2.**).

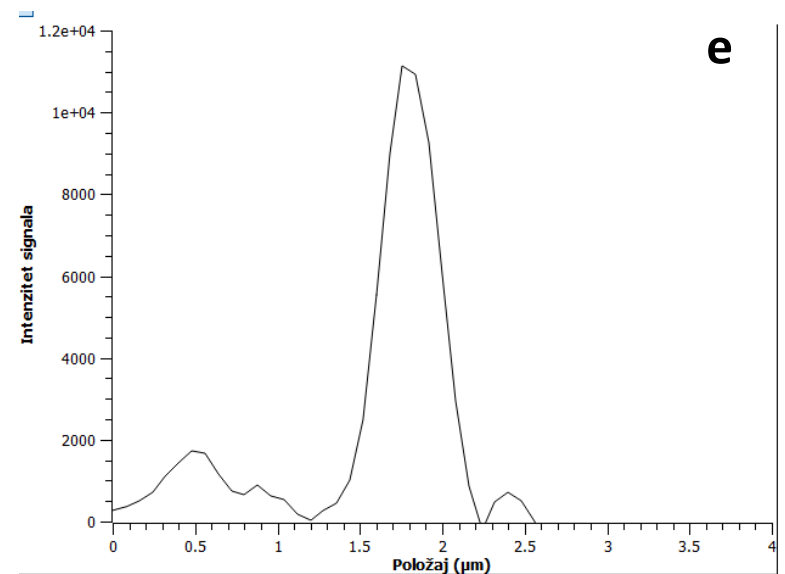
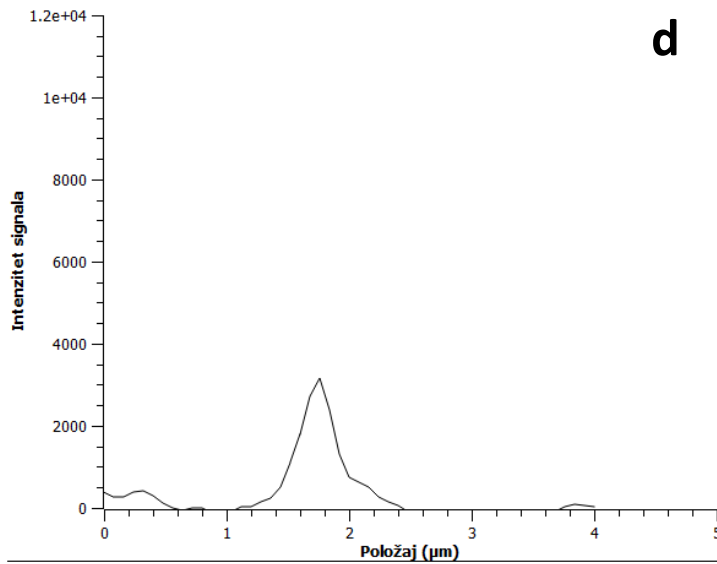
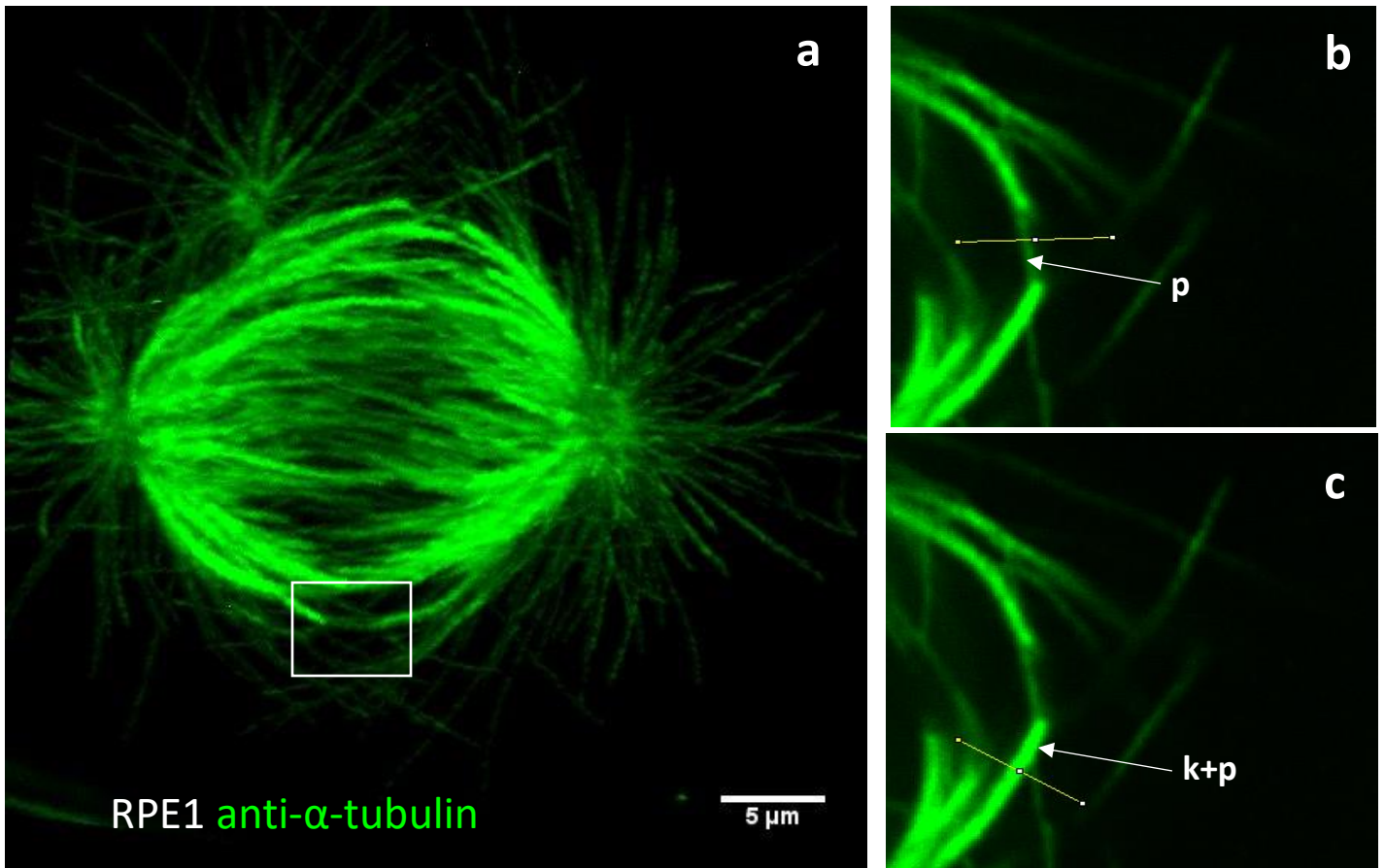
Tablica 2.

Duljina (prije ekspanzije)	Širina (prije ekspanzije)	Duljina (nakon ekspanzije)	Širina (nakon ekspanzije)	Faktor ekspanzije
$11,14 \pm 1 \mu\text{m}$, n=20	$8,67 \pm 1 \mu\text{m}$, n=20	$28,1 \pm 5 \mu\text{m}$, n =65	$20 \pm 2,6 \mu\text{m}$, n =65	$2,5 \pm 0,8$, n =65

3.3. Broj mikrotubula u premosnom vlaknu u ekspanziranom diobenom vretenu

U ovoj analizi mjereni su signali fluorescencije premosnog vlakna i kinetohornog vlakna te su njihovi omjeri poslužili da se izračuna relativni broj mikrotubula u premosnom vlaknu u odnosu na kinetohorno vlakno. 65 stanica od kojih je 59 iz RPE1 netumorske stanične linije, a 6 stanica iz U2OS tumorske stanične linije, bilo je pogodno za analizu (npr. mjerenje duljina i širina vretena), a signali fluorescencije izmjereni su na 15 premosnih i kinetohornih vlakana u 7 stanica, od kojih je 6 RPE1 stanica i 1 U2OS stanica, iz 5 nezavisnih eksperimenata. U jednoj stanici s odličnim signalom moglo se prepoznati 4 premosna vlakna.

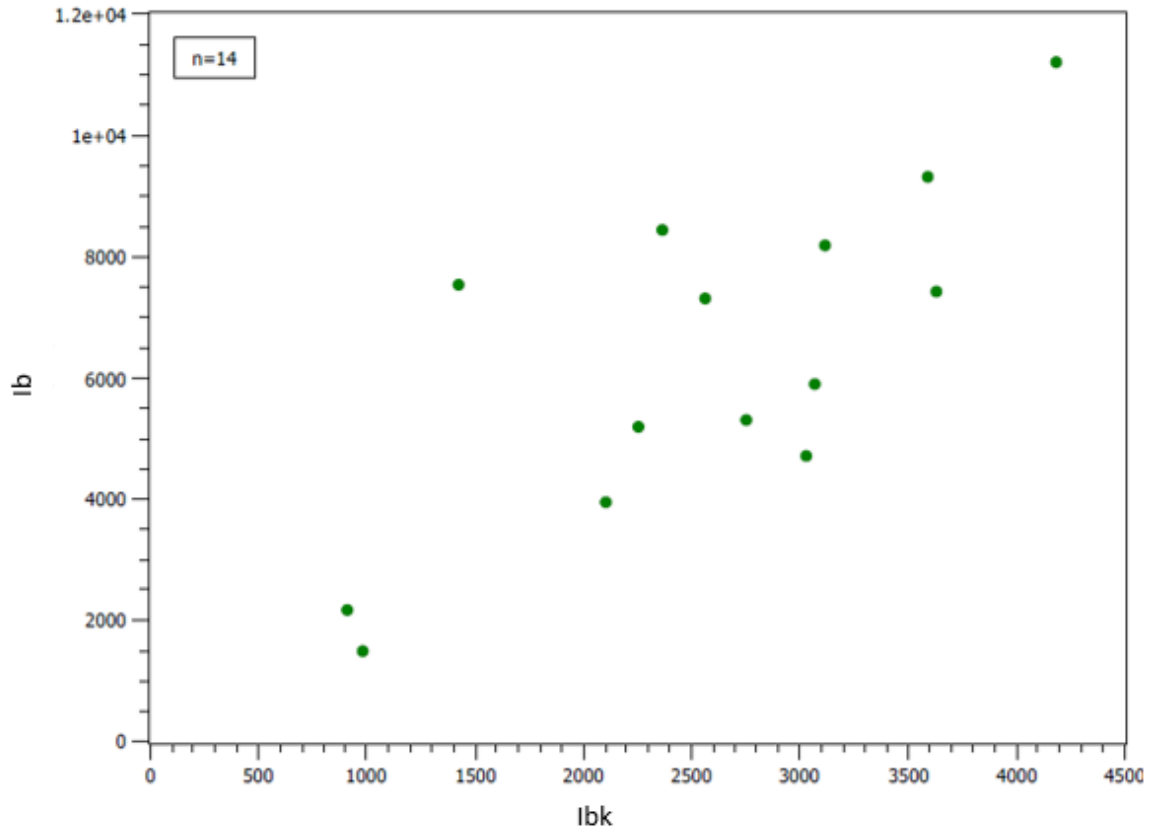
U ovom radu do broja mikrotubula u premosnom vlaknu se došlo mjerenjem signala fluorescencije premosnog vlakna te usporedbom sa signalom fluorescencije kinetohornog vlakna. Profil signala fluorescencije može se prikazati grafički, što je i prikazano na **slici 25. d** za premosno vlakno, te na **slici 25. e** za kinetohorno vlakno. Uz profile signala fluorescencije prikazane su i slike na kojima se vidi točno mjesto na kojem se mjerio taj intenzitet signala fluorescencije na premosnom vlaknu i na kinetohornom vlaknu, ta mjesta označena su alatom linije u programu ImageJ što je prikazano na **slikama** pod **25. b i d**. Na **slici 25. a**. prikazana je maksimalna projekcija svih ravnina stanice RPE1 koja je jedna od reprezentativnih stanica u kojima se mogao izdvojiti veći broj dobro vidljivih premosnih vlakana.



Slika 25. Mjerenje signala fluorescencije prenosnog i kinetohornog vlakna. (a) Maksimalna projekcija svih z-ravnina ekspanzirane RPE1 stanice. Jedna od reprezentativnih ekspanziranih stanica u kojima se dobro raspoznaju kinetohorna i prenosna vlakna, te astralni mikrotubuli. Iz te

stanice se kretanjem po z-ravninama moglo izdvojiti čak 4 premosna vlakna za daljnje analiziranje. Bijelim pravokutnikom označen je dio snimke koji je uvećan na slikama (b) i (c). Skala = 5 μm . (b) Uvećani dio snimke ekspanzirane RPE1 stanice sa slike 24. (a). Izdvojen je dio s dobro prepoznatljivim kinetohornim i premosnim vlaknom. Kroz središte premosnog vlakna (označeno slovom p - premosno vlakno) provučen je alat linije, duljine 4 mikrometra, a širine 1 piksel, kojim se mjerio signal intenziteta fluorescencije premosnog vlakna, prikazan na slici pod (d). (c) Uvećani dio snimke ekspanzirane RPE1 stanice sa slike 24. (a). Kroz središte jednog kinetohornog vlakna (označeno slovima k+p - kinetohorno i premosno vlakno) provučen je alat linije, duljine 4 mikrometra i širine 1 piksel, kojim se mjerio signal intenziteta fluorescencije kinetohornog i premosnog vlakna, prikazan na slici pod (e).

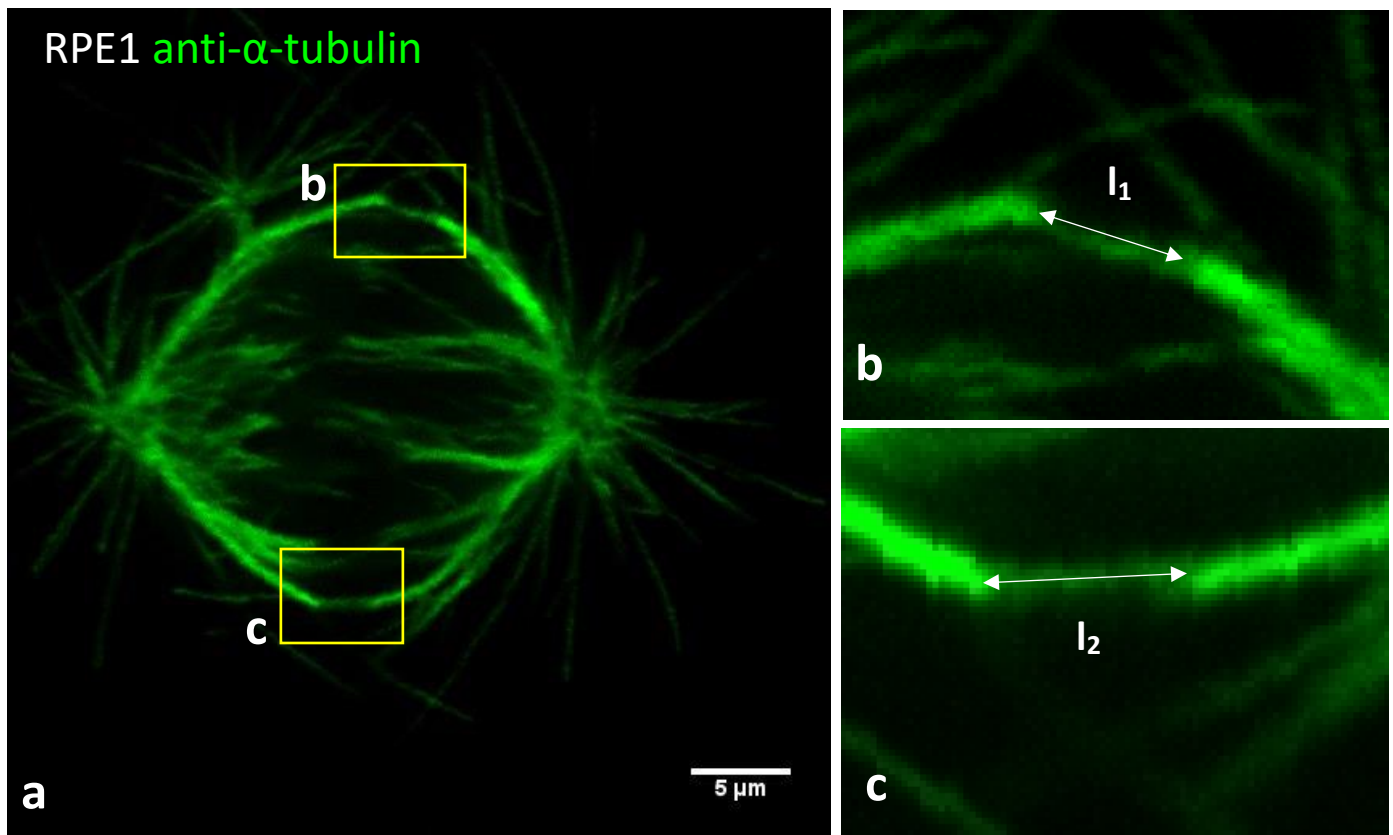
Grafički prikaz ovisnosti signala intenziteta mikrotubula između dvije sestrinske kinetohore (I_b) o signalu kinetohornog vlakna, mjenog u blizini kinetohore (I_{bk}) iz ovog rada prikazan je na **slici 26**. U postotcima taj omjer za ovaj rad iznosi $44 \pm 1.3\%$. Broj mikrotubula premosnog vlakna računao se tako da premosno vlakno sadrži $I_b/I_k = (I_b/I_{bk}) / (1 - I_b/I_{bk})$ od broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu, točnije $I_b/I_k = (I_b/I_{bk}) / (1 - I_b/I_{bk}) = 78 \pm 6\%$ od broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu. Prosječan broj mikrotubula u premosnom vlaknu za RPE1 stanice u ovom radu iznosi $13,7 \pm 2$ mikrotubula. Broj mikrotubula u kinetohornom i premosnom vlaknu iznosi 17,5 mikrotubula (Dudka i sur., 2018).



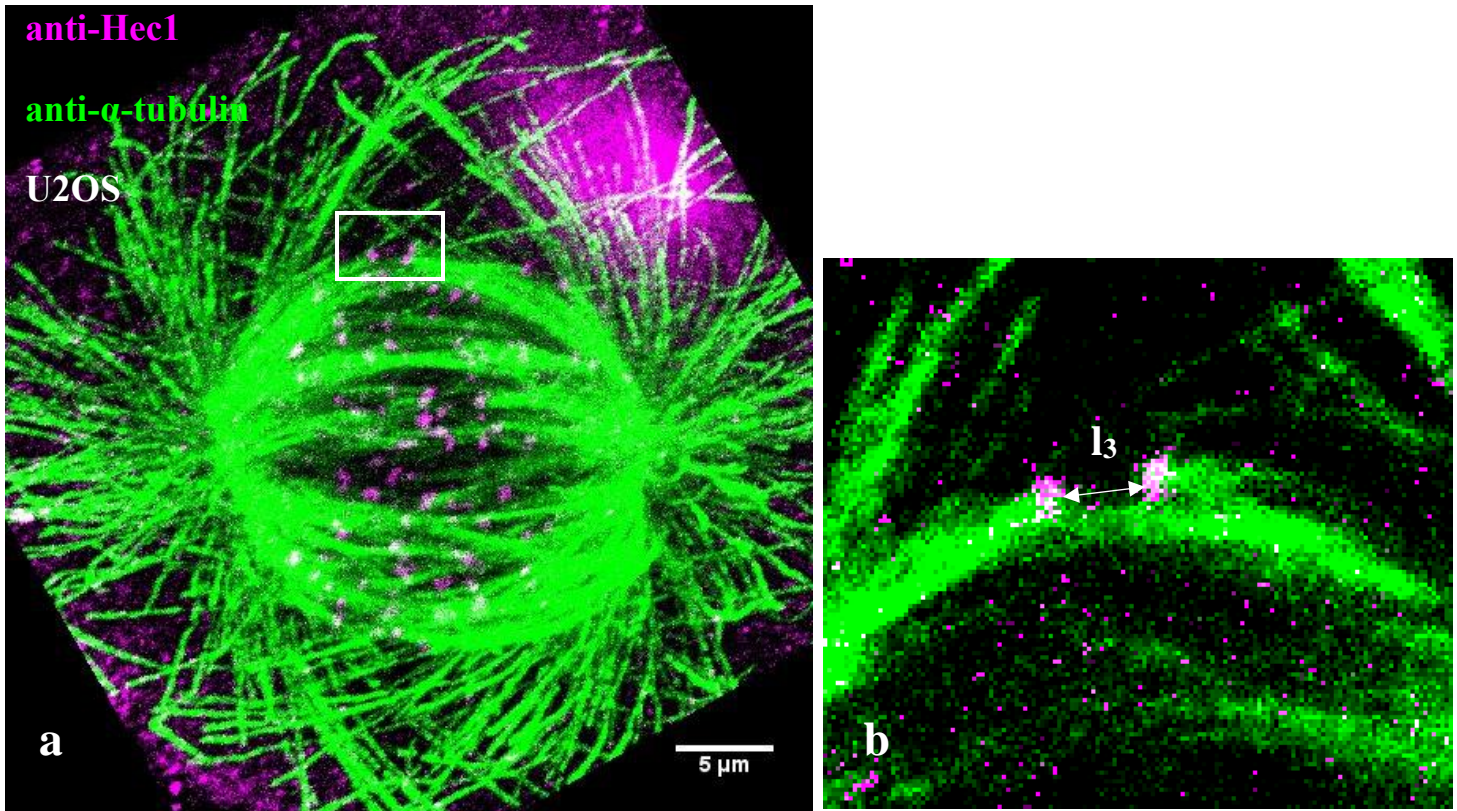
Slika 26. Grafički prikaz ovisnosti signala intenziteta mikrotubula između dvije sestrinske kinetohore (Ib) o signalu kinetohornog vlakna, mjenenog u blizini kinetohore (Ibk). Napravljeno je 14 mjerenja (n=14) u 7 stanica iz 5 nezavisnih eksperimenata. Analizirano je 13 mjerenja iz RPE1 stanične linije i 1 mjerenje iz U2OS stanične linije, obilježene s primarnim antitijelom protiv tubulina.

3.4. Udaljenost između sestrinskih kinetohora

Udaljenost između sestrinskih kinetohora je u ovom radu mjerena na 14 parova sestrinskih kinetohora, od kojih je 13 parova kinetohora iz RPE1 stanične linije, te 1 par sestrinskih kinetohora iz U2OS stanične linije, u 7 stanica iz 5 nezavisnih eksperimenata. Na 13 parova sestrinskih kinetohora u RPE1 stanicama, udaljenost između kinetohora se mjerila kao udaljenost između unutarnjih rubova kinetohornih i premosnih vlakana jer kinetohore nisu bile obilježene (posljedica fiksacije). Na 1 paru sestrinskih kinetohora koji je bio iz U2OS stanice, udaljenost se mjerila kao udaljenost između dvije obilježene sestrinske kinetohore. U ovom radu prosječna udaljenost između sestrinskih kinetohora je $3 \pm 1 \mu\text{m}$, ali mora se uzeti u obzir da su to ekspandirane stanice te podijeliti taj broj s prosječnim faktorom ekspanzije koji je u ovom radu $2,5 \pm 0,8$. Omjer udaljenosti između sestrinskih kinetohora na ekspandiranim stanicama te faktora ekspanzije iznosi $1,2 \pm 0,25 \mu\text{m}$. Na **slici 27. a.** prikazano je jedno od ekspandiranih diobenih vretena na kojem se mjerila udaljenost između sestrinskih kinetohora, a na slikama **27. b. i c.** uvećani dio istog diobenog vretena, na kojem se vide kinetohorna vlakna čiji su rubovi, s obje strane premosnog vlakna, poslužili kao početna i završna točka linije kojom se mjerila udaljenost između sestrinskih kinetohora. Na **slici 28. a.** prikazano je ekspandirano diobeno vreteno koje je imalo vidljive kinetohore koje su poslužile za mjerenje udaljenosti od jedne sestrinske kinetohore do druge kao što je vidljivo na **slici 28. b.**



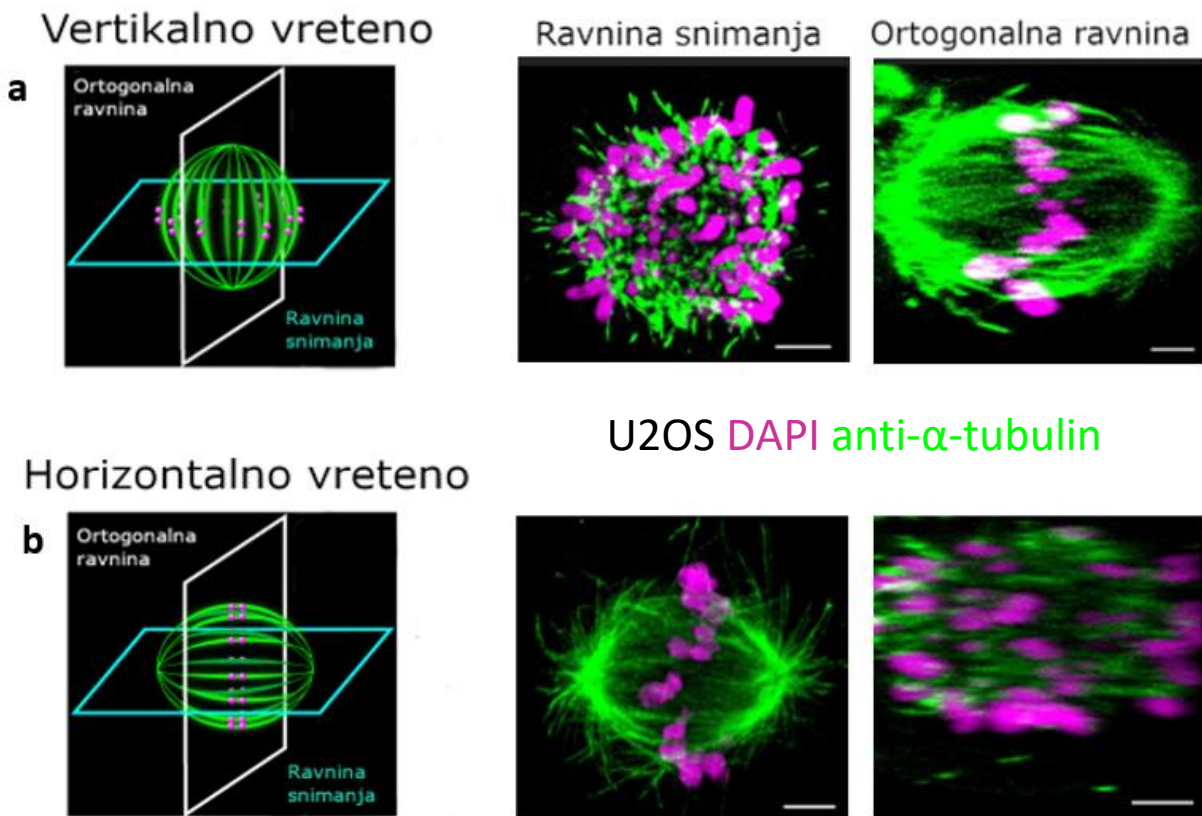
Slika 27. **Prikaz mjerenja udaljenosti između sestrinskih kinetohornih vlakana u RPE1 stanicima.** (a) Maksimalna projekcija 2 z-ravnine ekspanirane RPE1 stanice koja je obilježena antitijelom protiv tubulina (zeleno) u kojoj se mogu izdvojiti dva premosna vlakna, izdvojena u pravokutniku i uvećana na slikama (b) i (c). (b) Uvećani prikaz premosnog vlakna između dva kinetohorna vlakna. Bijelom strelicom je prikazano od kuda do kuda se mjerila udaljenost između dvije sestrinske kinetohore (l_1) ako stanica nije imala vidljive kinetohore. (c) Uvećani prikaz premosnog vlakna između dva kinetohorna vlakna. Bijelom strelicom je prikazano od kuda do kuda se mjerila udaljenost između dvije sestrinske kinetohore (l_2) ako stanica nije imala vidljive kinetohore. Skala = 5 μm .



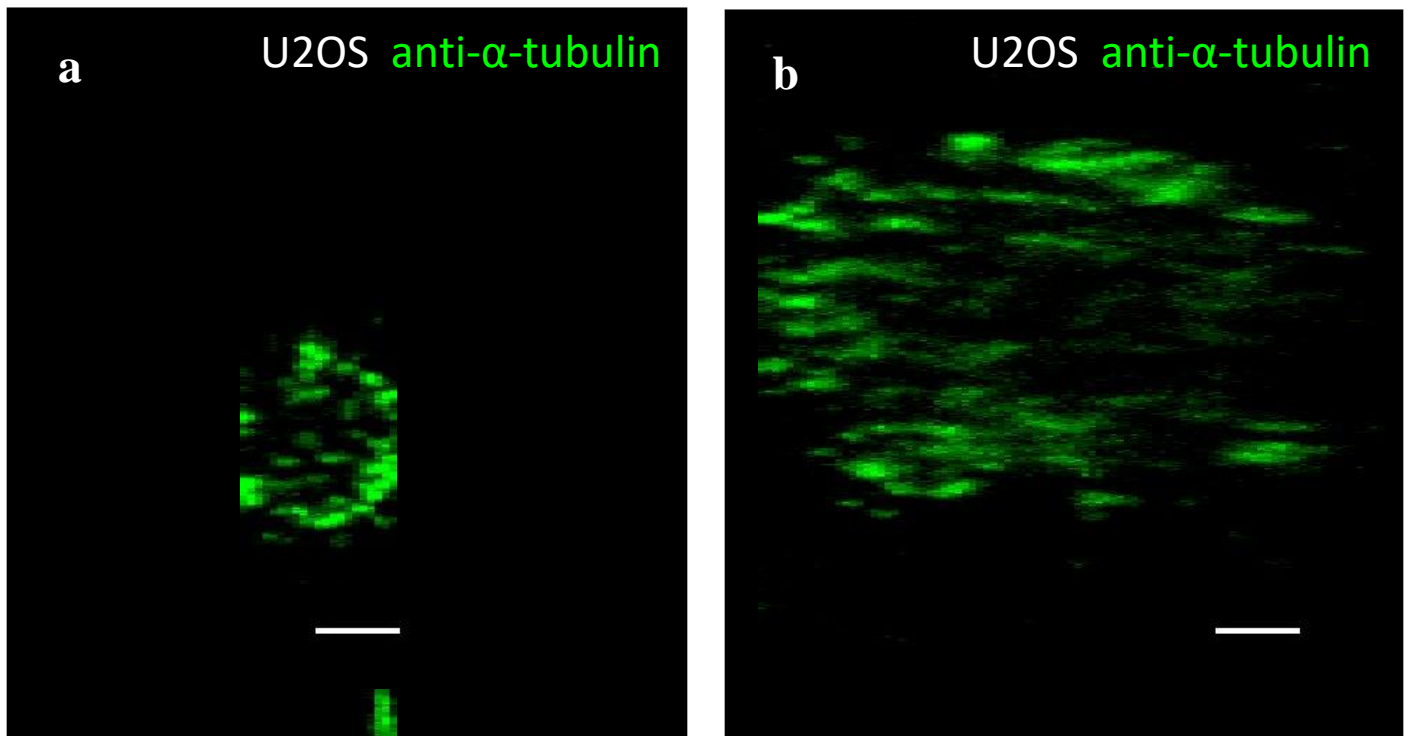
Slika 28. **Prikaz mjerenja udaljenosti između sestrinskih kinetohora u U2OS stanici.** (a) Maksimalna projekcija svih z-ravnina ekspanzirane U2OS stanice koja je obilježena antitijelom protiv tubulina (zeleno) i antitijelom protiv kinetohornog proteina Hec1 (ružičasto), u kojoj se može izdvojiti premosno vlakno (u pravokutniku). (b) Uvećani prikaz premosnog vlakna između dvije sestrinske kinetohore. Bijelom strelicom je prikazano od kuda do kuda se mjerila udaljenost između dvije sestrinske kinetohore (l_3) ako je stanica imala vidljive kinetohore. Skala = 5 μ m

3.5. Horizontalni i vertikalni prikaz diobenog vretena snimljenog pomoću ekspanzijske mikroskopije

Snimljena ekspanzirana diobena vretena koja su bila ekspanzirana uz pomoć ekspanzijske mikroskopije u većini slučajeva bila su horizontalnoj ravnini. 2 diobena vretena iz U2OS stanične linije, obilježene antitijelom protiv tubulina i bojom DAPI za DNA, u jednom nezavisnom eksperimentu, snimljena su u vertikalnoj ravnini. Uz pomoć računalnog programa vertikalno snimljeno diobeno vreteno prebačeno je u horizontalno diobeno vreteno i obrnuto, horizontalno snimljeno diobeno vreteno, prebačeno je u vertikalno. Na **slici 29. a)** prikazano je diobeno vreteno snimljeno u vertikalnoj ravnini, te projekcija istog tog vretena u horizontalnoj ravnini, a na **slici 29. b)** prikazano je diobeno vreteno koje je snimljeno u horizontalnoj ravnini te njegova projekcija u vertikalnu ravninu. Uspoređena je ortogonalna ravnina horizontalno snimljenog vretena U2OS stanice prije ekspanzije, te ortogonalna ravnina horizontalno snimljenog vretena U2OS stanice nakon ekspanzije s obilježenim antitijelom protiv tubulina što se može vidjeti na **slici 30**. U ortogonalnoj projekciji horizontalno snimljenog vretena u U2OS stanici prije ekspanzije, u maksimaloj projekciji 2 z-ravnine, moglo se izbrojati 22 snopa mikrotubula koji se mogu raspoznati od svojih susjeda. U ortogonalnoj projekciji horizontalno snimljenog vretena iz druge U2OS stanice, snimljene nakon ekspanzije, u maksimaloj projekciji 2 z-ravnine, moglo se izbrojati 43 snopa mikrotubula koji se mogu raspoznati od svojih susjeda. Može se zaključiti da se ekspanzijskom mikroskopijom može jasnije razlučiti broj snopova mikrotubula u vertikalnom diobenom vretenu.



Slika 29. **Transformacija orijentacije diobenog vretena.** (a) Od lijeva na desno: Shema gledanja vertikalnog orijentiranog diobenog vretena; ekvatorijalna ravnina vertikalnog vretena u U2OS stanicama (DAPI-ružičasto, Rat anti- α -tubulin-zeleno); projekcija istog tog vretena u horizontalnu ravninu (DAPI-ružičasto, Rat anti- α -tubulin-zeleno). (b) Od lijeva na desno: Shema gledanja horizontalno orijentiranog diobenog vretena; ekvatorijalna ravnina horizontalnog vretena (legenda kao pod a); projekcija istog tog vretena u vertikalnu ravninu. Skala = 5 μ m. Slika je napravljena prema članku Novak i suradnika (2017).



Slika 30. Usporedba ortogonalne projekcije horizontalno snimljenog diobenog vretena iz U2OS stanice s obilježenim antitijelom protiv tubulina (zeleno), prije i nakon ekspanzije. (a) Maksimalna projekcija 2-z ravnine diobenog vretena prije ekspanzije, koje je transformirano iz horizontalne u vertikalnu ravninu te se na snimci može izbrojati 22 snopa mikrotubula. (b) Maksimalna projekcija 2-z ravnine diobenog vretena nakon ekspanzije, koje je transformirano iz horizontalne u vertikalnu ravninu te se na snimci može izbrojati 43 snopa mikrotubula. Skala = 5 μm .

4. RASPRAVA

4.1. Optimizacija protokola za ekspanzijsku mikroskopiju

Prvi cilj ovog rada bio je optimizirati protokol za ekspanzijsku mikroskopiju koji će se moći koristiti rutinski za super-rezolucijsku vizualizaciju proteina od interesa. Chozinski i sur. (2016) optimizirali su prvi protokol za ekspanzijsku mikroskopiju (Chen i sur.,2015) tako što su ga prilagodili za korištenje uobičajenih antitijela i fluorescentnih proteina i taj protokol je u ovom radu bio početni protokol koji se dalje optimizirao. Prvi korak optimizacije bila je sinkronizacija inhibitorom RO-3306. Inhibitor RO-3306 je selektivni malo-molekulski inhibitor CDK1 (engl. cyclin-dependent kinase) koji reverzibilno zaustavlja ljudske stanice na G2/M granici staničnog ciklusa i dopušta efektivnu sinkronizaciju stanica u ranoj mitozu (Vassilev i sur.,2006). To je potrebno jer se ekspanzivanjem uzorka povećava i razmak između stanica što otežava pronalazak diobenih vretena u uzorku, a uz pomoć sinkronizacije, povećava se broj diobenih vretena. Također stanice u diobi, nakon dodatka inhibitora RO-3306 i njegova ispiranja, većinom su u istoj fazi diobe što olakšava mikroskopiranje nakon ekspanziranja stanica. Nakon ispiranja inhibitora RO-3306 sa stanica, te dodatka svježeg medija na stanice, variranjem vremena prije fiksacije stanica, moglo se odrediti u kojoj će fazi diobe biti većina stanica. Eksperimentalno je zaključeno da je nakon 30 minuta od ispiranja inhibitora RO-3306 većina stanica bila u prometafazi te se fiksacijom stanica nakon tih 30 minuta mogao dobiti uzorak koji ima većinu diobenih vretena u prometafazi. Da bi u uzorku dobili veću populaciju diobenih vretena u metafazi, korišten je još jedan inhibitor, MG-132 inhibitor. MG-132 je peptid aldehid (Z-Leu-Leu-Leu-al) koji selektivno blokira proteolitičku aktivnost 26S proteasoma. Ovaj inhibitor se koristi kao alat za remećenje degradacije unutarstaničnih proteina koji su regulirani proteosomima (Lee i Goldberg, 1998). Proteosomski inhibitori poput MG-132 inhibitora induciraju mitotske stanice da se zaustave u metafazi (Potapova i sur., 2006).

4.2. Fiksacija stanica prije ekspanzijske mikroskopije

Drugi korak optimizacije protokola u ovom radu, bio je način fiksacije. Fiksacija je jedan od najvažnijih koraka u ekspanzijskoj mikroskopiji jer o njoj ovisi krajnji rezultat ekspanzijske mikroskopije te i sam faktor ekspanzije. Chozinski i sur. (2016) navode faktor ekspanzije od 4-4,2 što znači da se uzorak uvećao za 4-4,2 puta. Taj faktor ekspanzije računao se za stanice koje su

prethodno smanjene kao posljedica fiksacije, te je zato dosta velik. Ekspanzija u članku Chozinskog i suradnika (2016.) bila bi približno jednaka faktoru ekspanzije u ovom radu, da se mjerila samo ekspanzija stanica koje su bile normalne veličine, a ne ekspanzija nakon smanjivanja. Faktor ekspanzije u ovom radu je $2,5 \pm 0,8$. Može se primijetiti da je standardna devijacija dosta velika, 0,8, što govori da je u nekim eksperimentima ekspanzija bila jako uspješna, dok u nekima nije, što je najčešće bila posljedica fiksativa koji bi smanjio veličinu diobenog vretena već prije ekspanzije. Međutim, većina analiziranih diobenih vretena u ovom radu nije bila smanjena kao posljedica fiksativa. U ovom radu korišteni su fiksativi na bazi aldehida, najčešće u mješavini s tvarima za permeabilizaciju, kao i organski fiksativi. U budućnosti bi bilo potrebno istu stanicu koja je snimljena prije ekspanzije, snimiti i nakon ekspanzije, te bi se tek tada mogao izračunati pravi faktor ekspanzije. To nije napravljeno u ovom radu jer se nije uspjela pronaći ista stanica koja je snimljena prije ekspanzije u gelu koji je ekspandiran.

U rezultatima je spomenuto kako je stanica koja je imala manji faktor ekspanzije imala bolji signal fluorescencije od stanice koja je bila veća, odnosno imala veći faktor ekspanzije. Postoji nekoliko razloga koji bi mogli biti uzrok tome. Kao prvo, stanice na snimkama nisu iz iste stanične linije, te je moguće da različite stanične linije imaju različitu kvalitetu signala fluorescencije. Drugi razlog mogao bi biti taj da što je veći faktor ekspanzije, to je slabiji signal fluorescencije, ali da bi se to potvrdilo, trebalo bi napraviti eksperiment sa stanicama iz iste stanične linije, te jednu ekspandirati više od druge i usporediti kvalitetu signala. Treći razlog može biti taj da je stanica koja je manja, odnosno ima manji faktor ekspanzije, bila prvotno smanjena fiksacijom, te je ekspandiranjem dosegla maksimalnu veličinu odnosno maksimalni faktor ekspanzije, a signal je ostao kvalitetan.

Fiksativi na bazi aldehida, uključujući formaldehid (formalin kada je u tekućem obliku (Kiernan 2000)), paraformaldehid i glutaraldehid, ponašaju se kao umrežujući agensi koji reagiraju s proteinima i nukleinskim kiselinama u stanici (Srinivasan i sur., 2002; Troiano i sur., 2009). Formaldehid, je široko upotrebljavana metoda fiksacije koja rezultira s niskom razinom smanjenja stanica, te dobrim očuvanjem stanične strukture za širok spektar stanica i tkiva te ne rezultira važnijim strukturnim promjenama na proteinima (Hobro i Smith, 2017). Međutim, postoje indicije da formaldehid može rezultirati u efektima poput naticanja stanične membrane kao i udubljenja, te stvaranja vakuola na ili blizu jezgrine i mitohondrijske membrane (Fox i sur., 1985). Iako svi aldehidni fiksativi djeluju kao umrežujući agensi, priroda umreživanja može utjecati na

učinkovitost fiksacije, na primjer, glutaraldehid je pokazan kao efikasniji za očuvanje DNA veće molekulske mase od formaldehida, ali uzrokuje slabiju imunoreaktivnost tijekom imuno-označavanja (Hobro i Smith, 2017). U ovom radu pokazano je da je glutaraldehid efikasniji fiksativ od paraformaldehida jer je bolje očuvao proteine od interesa. Sama fiksacija s paraformaldehidom, uzrokovala je smanjenje diobenog vretena već prije ekspanzijske mikroskopije, dok je fiksacijom s glutaraldehidom prirodna veličina diobenog vretena bila očuvana.

Organska otapala kao metanol, aceton i etanol čuvaju stanice kroz proces dehidracije i precipitacije proteina (Vielkind i Swierenga, 1989). Ovi fiksativi su pokazani uspješnijima pri očuvanju nukleinskih kiselina u stanicama od fiksativa na bazi aldehida, ali po cijenu strukture stanične membrane, gubitka citoplazmatskih organela te uz oštećenje mikrotubula (Hoetelmans i sur., 2001). Međutim, metanol se često koristi tijekom imuno-označavanja jer omogućuje visoku razinu imuno-označavanja zajedno s niskom razinom pozadine i ne-specifičnog vezanja antitijela (Hobro i Smith, 2017). Metanol je u ovom radu bio samo isproban, nakon čega više nije korišten. U ovom radu bilo je bitno dobiti jasne snimke mikrotubula, što fiksacijom s metanolom nije bilo moguće te zato metanol nije bio više korišten. Također se pokazalo da smanjuje veličinu diobenog vretena što za ekspanzijsku mikroskopiju nije prihvatljivo.

Za potrebe vizualiziranja nekih drugih proteina, protokol bi se opet morao optimizirati i trebao bi se pronaći fiksativ koji će najbolje sačuvati željeni protein. Također za druge proteine i drugi koraci u protokolu bi zahtijevali optimizaciju, jedan od tih koraka je i korak s digestijskim puferom, prije same ekspanzije, jer različiti proteini imaju različitu otpornost na digestiju enzimima. Jedan od proteina na čijem bi se ekspanziranju moglo raditi u budućnosti je protein PRC1 čije bi ekspanzirane snimke mogle pridonijeti objašnjenju njegove funkcije u diobenom vretenu. PRC1 je protein koji povezuje mikrotubule te ih spaja u snopove i esencijalan je za održavanje unutrašnjosti diobenog vretena (Mollinari i sur., 2002).

4.3. Mjerenje broja mikrotubula u premosnom vlaknu

Ovisnost signala intenziteta mikrotubula između dvije sestrinske kinetohore (Ib) o signalu kinetohornog vlakna, mjerenog u blizini kinetohore (Ibk), mjerenog u HeLa stanicama je uglavnom konstantan i iznosi $Ib/Ibk=45\pm 2\%$ ($n=37$ stanica) te je iz tog omjera zaključeno je da premosno vlakno sadrži $Ib/Ik=(Ib/Ibk)/(1-Ib/Ibk)=82\pm 7\%$ od broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu (Kajtez i sur., 2016). Rezultati dobiveni u ovom radu odgovaraju po vrijednosti rezultatima

iz članka Kajteza i suradnika (2016). U ovom radu broj mikrotubula premosnog vlakna mjeren je na isti način kao i u članku, samo što je mjeren na ekspanziranim diobenim vretenima te je zbog toga postojala manja mogućnost pogreške jer je signal bio jasniji. Članak Kajteza i suradnika (2016.) i ovaj rad razlikuju se u vrsti korištenih stanica. U članku su korištene HeLa stanice, a u ovom diplomskom radu su korištene RPE1 i U2OS stanice, te su unatoč tome dobivene iste vrijednosti, što ukazuje da se broj mikrotubula u premosnom vlaknu ne razlikuje mnogo u različitim vrstama stanica.

Prijašnja mjerenja iz elektronskih mikrografa su pokazala da kinetohorna vlakna u HeLa stanicama sadrže $n_k=17\pm 2$ mikrotubula (McEwen i sur., 2001). To znači da se premosna vlakna sastoje od $n_b=14\pm 2$ mikrotubula (Kajtez i sur., 2016). Na kinetohore u RPE1 staničnoj liniji veže se prosječno 17,5 mikrotubula (Dudka i sur., 2018), te se pomoću tog broja mogao izračunati broj mikrotubula u premosnom vlaknu za RPE1 stanice. Slične vrijednosti, $I_b/I_{bk}=46\pm 1\%$ ($n=27$ premosnih vlakana iz 20 stanica) dobivene su u unutrašnjosti vretena na primjerima kinetohornih vlakana koji su se mogli razlikovati od svojih susjeda, međutim, analiza se nastavila samo na vanjskim kinetohornim vlaknima jer se ona najlakše raspoznaju od ostalih vlakana (Kajtez i sur., 2016). U ovom radu, iako su slike diobenih vretena super-rezolucijske, analiza se radila samo na vanjskim kinetohornim vlaknima jer se kinetohorna i premosna vlakna u unutrašnjosti nisu mogla dobro razlikovati od svojih susjeda zbog mnoštva novih informacija dobivenih ekspanzijskom mikroskopijom.

4.4. Udaljenost između sestrinskih kinetohora

Udaljenost između sestrinskih kinetohora u HeLa stanicama iznosi $1,05\pm 0,32 \mu\text{m}$ ($n=52$), a u PtK1 stanicama ta udaljenost iznosi $1,92 \pm 0,54 \mu\text{m}$ ($n=50$) (Kajtez i sur., 2016). U ovom radu udaljenost između sestrinskih kinetohora za RPE1 i U2OS stanice iznosi $1,2 \pm 0,25 \mu\text{m}$ ($n=14$). Broj stanica je u ovom radu relativno malen zbog toga što su izabrane samo stanice na kojima se jasno vide obje kinetohore ili bar gdje se jasno vidi premosno vlakno, a takvih stanica, nije bilo mnogo zbog prethodno spomenutog problema s fiksativom. Udaljenost se mjerila na način da su rubovi kinetohornih vlakana, s obje strane premosnog vlakna, poslužili kao početna i završna točka linije kojom se mjerila udaljenost između sestrinskih kinetohora. Udaljenost između sestrinskih kinetohora u RPE1 stanicama iznosi prosječno $\sim 1,22 \mu\text{m}$ (Shirnekhi i sur., 2017)

što je isto kao i u ovom radu. Udaljenost između sestrinskih kinetohora u U2OS stanicama $0,81 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ($n=100$ stanica) (Milas i Tolić, 2016).

4.5. Transformacija orijentacije diobenog vretena

Da bi se dobila kompletna trodimenzionalna kontura snopova mikrotubula, korištena su vertikalno orijentirana diobena vretena, koja se povremeno mogu naći u populaciji mitotskih stanica. U takvim vretenima, optički odjeljci su grubo okomiti na snopove mikrotubula te dopuštaju precizno određivanje lokacije snopa u svakom odjeljku, a tako i cijelu tro-dimenzionalnu konturu. Otkriveno je da pojedini snopovi slijede lijevi spiralni put duž osi vretena. Da se ispita je li kiralnost specifično svojstvo vertikalnih vretena, izmjerena je i prosječan helicitet snopova u fiksiranim horizontalnim vretenima. Snopovi u horizontalno orijentiranim vretenima pokazani su da slijede lijevi spiralni put duž osi vretena kao i u vertikalnim vretenima (Novak i sur., 2017). U ovom radu snimljena ekspanzirana diobena vretena koja su bila ekspanzirana uz pomoć ekspanzijske mikroskopije u većini slučajeva bila su horizontalnoj ravnini. 2 diobena vretena u jednom nezavisnom eksperimentu snimljena su u vertikalnoj ravnini. Snimke ekspanziranih diobenih vretena su super-rezolucijske slike koje otkrivaju mnoštvo detalja koji nisu vidljivi na snimkama vretena snimljenih uobičajenim konfokalnim mikroskopom. Računalnim upravljanjem slikama ekspanziranih vretena mogu se proučavati vertikalna, ali i horizontalna diobena vretena, te potencijalno otkriti nove podatke o trodimenzionalnoj arhitekturi diobenog vretena. U ovom radu usporedile su se snimke vertikalnih diobenih vretena prije i nakon ekspanzije te se na snimci ekspanziranog diobenog vretena moglo izbrojati duplo više snopova mikrotubula jer je rezolucija slike bila puno bolja te je vreteno bilo duplo veće. U budućnosti bi se trebalo snimiti veći broj ekspanziranih stanica koje se mogu transformirati u vertikalne stanice te bi se na tim stanicama mogla proučavati trodimenzionalna arhitektura diobenog vretena.

5. ZAKLJUČAK

Analizom RPE1 te U2OS stanica snimljenih laserskim pretražnim mikroskopom nakon protokola ekspanzijske mikroskopije može se zaključiti da je optimizirani protokol uspješan i da se može rutinski koristiti u laboratoriju za super-rezolucijske snimke vretena s označenim mikrotubulima, kinetohorama, te DNA. Protokol se može koristiti i za označavanje i ekspanziranje i drugih proteina, ali onda zahtjeva dodatnu optimizaciju koja će sačuvati proteine od interesa te ih uspješno ekspanzirati. Jedan od najbitnijih koraka u protokolu ekspanzijske mikroskopije je fiksacija i permeabilizacija stanica te je primjećeno da izbor fiksativa mora ovisiti o proteinu koji se želi vizualizirati jer različiti fiksativi različito djeluju na iste proteine.

U ovom radu izmjerene su duljine i širine prometafaznih i metafaznih diobenih vretena prije i poslije ekspanzije. Prosječna duljina prometafaznih i metafaznih diobenih vretena prije ekspanzije je $11,14 \pm 1 \mu\text{m}$, a prosječna širina prije ekspanzije je $8,67 \pm 1 \mu\text{m}$, $n=20$. Prosječna duljina prometafaznih i metafaznih vretena nakon ekspanzije je $28,1 \pm 5 \mu\text{m}$, a prosječna širina nakon ekspanzije je $20 \pm 2,6 \mu\text{m}$. Pomoću tih vrijednosti mogao se izračunati prosječni faktor ekspanzije za protokol ekspanzijske mikroskopije iz ovoga rada i on iznosi $2,5 \pm 0,8$.

U ovom radu mjerio i se signal fluorescencije premosnih i kinetohornih vlakana, te se pomoću dobivenih vrijednosti izračunao prosječan broj mikrotubula u premosnom vlaknu u odnosu na kinetohorno vlakno u ekspanziranim RPE1 i U2OS stanicama. Broj mikrotubula vezanih na kinetohore u ljudskim stanicama iznosi prosječno 17,5 mikrotubula (Dudka i sur., 2017), što znači da je prosječan broj mikrotubula u premosnom vlaknu ljudske stanice $13,65 \pm 1,95$.

Analizom snimaka ekspandiranih diobenih vretena može se izračunati i udaljenost između sestrinskih kinetohora koja u ovom radu iznosi $1,2 \pm 0,25$ za RPE1 stanice i može se usporediti s rezultatima Shirnekhia i suradnika (2017) gdje je ta udaljenost približno $\sim 1,22 \mu\text{m}$.

Mjerenjem ovih veličina dobivene su informacije o učinkovitosti optimiziranog protokola za ekspanzijsku mikroskopiju. U daljnjim istraživanjima potrebno je provjeriti signifikantnost ovih rezultata usporedbom s vrijednostima dobivenim za veći broj stanica. Također, potrebno je pronaći korak u protokolu za ekspanzijsku mikroskopiju, čijom se promjenom, protokol može optimizirati za razne proteine od interesa, a ne samo one analizirane u ovom radu.

6. LITERATURNI IZVORI

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007): *Molecular biology of the cell*, Fifth Edition, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 69-75.
- Balchand S. K., Mann B. J., Wadsworth P., (2016): Using Fluorescence Microscopy to Study Mitosis, *Methods Mol. Biol.* 1413:3-14.
- Beaudouin J., Gerlich D., Daigle N., Eils R., Ellenberg J., (2002): Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina, *Cell*, 108: 83-96.
- 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.
- Chang J., Chen F., Yoon Y., Jung E. E., Babcock H., Kang J. S., Asano S., Suk H., Pak N., Tillberg P. W., Wassie A. T., Cai D., Boyden E. S., (2017): Iterative expansion microscopy, *Nat Methods* 14: 593-599.
- Cheeseman I. M., Desai, A. (2008): Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 33-46
- Chen F., Tillberg P.W., Boyden E.S., (2015): Expansion Microscopy, *Science* 347: 543–548.
- Chozinski T.J., Halpern A.R., Okawa H., Kim H.J., Tremel G.J., Wong R.O., Vaughan J.C., (2016): Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins, *Nat Methods* 6: 485-8.
- Cojoc G., Florescu A. M., Krull A., Klemm A. H., Pavin N., Jülicher F., Tolić I. M., (2016): Paired arrangement of kinetochores together with microtubule pivoting and dynamics drive kinetochore capture in meiosis I, *Sci. Rep.* 6:25736
- Cooper G. M., Hausman R. E. (2004): *Stanica: molekularni pristup*, treće izdanje, Zagreb, Medicinska naknada.
- Dudka D., Noatynska A., Smith C.A., Liaudet N., McAinsh A.D., Meraldi P., (2018): Complete microtubule–kinetochore occupancy favours the segregation of merotelic attachments, *Nat Commun*, 9: 2042.
- Firat – Karalat E. N., Stearns T., (2014): The centriole duplication cycle, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 369: 1-10.

- Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P., (1985): Formaldehyde fixation, *J. Histochem. Cytochem.* 33: 845-853.
- Galderisi U., Jori F.P., Giordano A., (2003): Cell cycle regulation and neural differentiation, *Oncogene*, 22: 5208-19.
- Hobro A.J., Smith N.I., (2017): An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging, *Vibrational Spectroscopy* 91: 31-45
- Hoetelmans, R.W.M., Prins, F.A., Velde, I.C., Van der Meer, J., Van de Velde, C.J.H., Van Dierendonck, J.H., (2001): Effects of acetone, methanol, or paraformaldehyde on cellular structure, visualized by reflection contrast microscopy and transmission and scanning electron microscopy, *Appl. Immunohisto. M. M.*, 9: 346-351.
- I. Weber, Glasilo IRB, (2004)
- Imoto Y., Yoshida Y., Yagisawa F., Kuroiwa H., Kuroiwa T., (2011): The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations, *J. Electron Microsc* 60: S117–S136.
- Jackson P.K., (2008): The hunt for cyclin, *Cell*, 134: 199-202
- Kajtez J., Solomatina A., Novak M., Polak B., Vukušić K., Rüdiger J., Cojoc G., Milas A., Šumanovac Šestak I., Risteski P., Tavano F., Klemm A. H., Roscioli E., Welburn J., Cimini D., Glunčić M., Pavin N., Tolić I. M., (2016): Overlap microtubules link sister k-fibers and balance the forces on bioriented kinetochores, *Nat. Commun.* 7: 1-11.
- Kalinina I., Nandi A., Delivani P., Chacón M. R., Klemm A. H., Ramunno-Johnson D., Krull A., Lindner B., Pavin N., Tolić-Nørrelykke I. M., (2012): Pivoting of microtubules around the spindle pole accelerates kinetochore capture, *Nat. Cell Biol.*, 15: 82-87.
- Kiernan, J.A., (2000): Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do, *Microscopy Today*, 00–1
- Lee D. H., Goldberg A. L., (1998): Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.*, 8(10):397-403.
- Lu D., Hsiao J.Y., Davey N.E., Van Voorhis V.A., Foster S.A., Tang C., Morgan D.O., (2014): Multiple mechanisms determine the order of APC/C substrate degradation in mitosis, *J. Cell. Biol.* 207: 23-39.
- Maiato M., Sampaio P., Sunkel C. E., (2004): Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis, *Int. Rev. Cytol.*, 241: 53-153.

Mastronarde D.N., McDonald K.L., Ding R., McIntosh J.R., (1993): Interpolar spindle microtubules in PTK cells, *J. Cell. Biol.*, 123: 1475-1489.

McDonald K., O'Toole E. T., Mastronarde D. N., McIntosh J. R., (1992): Kinetochore microtubules in PTK cells. *J. Cell. Biol.*, 118: 369-383.

McEwen, B. F., Chan G.K., Zubrowski B., Savoian M.S., Sauer M.T., Yen T.J., (2001): CENP-E is essential for reliable bioriented spindle attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells, *Mol. Biol. Cell* 12: 2776–2789.

McIntosh J.R., Molodtsov M.I., Ataullakhanov F.I., (2012): Biophysics of mitosis, *Q. Rev. Biophys.*, 45: 147-207.

Milas A., Tolić I. M., (2016): Relaxation of interkinetochore tension after severing of a k-fiber depends on the length of the k-fiber stub, *Matters Select*

Mitchison T., Kirschner M., (1984): Dynamic instability of microtubule growth, *Nature*, 312: 237-242.

Mollinari C., Kleman J., Jiang W., Schoehn G., Hunter T., Margolis R. L., (2002): PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone, *J Cell Biol.* 157(7): 1175–1186.

Nigg E. A., Stearns T., (2011): The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries, *Nat. Cell. Biol.* 13: 1154-1160.

Novak M., Polak B., Simunic J., Boban Z., Kuzmic B., Thomae A., Tolic I.M., Pavin N., (2017): The mitotic spindle is chiral due to torques generated by motor proteins, unpublished manuscript.

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.

Pavin N., Tolić I. M., (2016): Self-organization and forces in the mitotic spindle, *Annu. Rev. Biophys.*, 45: 279-298.

Potapova T. A., Daum J. R., Pittman B. D., Hudson J. R., Jones T. N., Satinover D. L., Stukenberg T., Gorbsky G. J., (2006): The Reversibility of Mitotic Exit in Vertebrate Cells, *Nature*, 440(7086): 954–958.

Shang F., Taylor A.,(2011): Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress, *Free Radical Bio. Med.*, 51: 5-16.

Shirnekhi H. K., Kelley E. P., DeLuca J. G., Herman J. A., (2017): Spindle assembly checkpoint signaling and sister chromatid cohesion are disrupted by HPV E6-mediated transformation, *Mol Biol Cell*. 28(15): 2035–2041.

Simunić J., Tolić I. M., (2016): Mitotic Spindle Assembly: Building the Bridge between Sister K-Fibers. *Trends Biochem. Sci.* 41: 824-833

Skoufias, D. A., Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Wilson, L. and Margolis, R. L. (2001). Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4492-4497.

Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S., (2002): Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids, *Am. J. Pathol.*, 161

Stegmeier F., Amon A., (2004): Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation, *Annu. Rev. Genet.*, 38: 203-232.

Tachiwana H., Kagawa W., Kurumizaka H., (2012): Comparison between the CENP-A and histone H3 structures in nucleosomes, *Nucleus*, 3: 6-11.

Tachiwana H., Kagawa W., Shiga T., Osakabe A., Miya Y., Saito K., Hayashi-Takanaka Y., Oda T., Sato M., Park S.Y., Kimura H., Kurumizaka H., (2011): Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A, *Nature*, 476: 232-235.

Tang, Z., Bharadwaj, R, Li., B. and Yu, H. (2001). Mad2-independent inhibition of APCcdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev. Cell* 1: 227-237.

Tolić I. M., Pavin N., (2016): Bridging the gap between sister kinetochores. *Cell Cycle*, 15: 1169-1170.

Troiano, N.W., Ciovacco, W.A., Kacena, M.A., (2009): The effects of fixation and dehydration on the histological quality of undecalcified murine bone specimens embedded in methylmethacrylate, *J. Histotechnol.*, 32: 27-31

van Buren V., Cassimeris L., Odde D. J., (2005): Mechanochemical Model of Microtubule Structure and Self-Assembly Kinetics, *Biophys. J.*, 89: 2911-2926.

Vassilev L.T., Tovar C., Chen S., Knezevic D., Zhao X., Sun H., Heimbrosk D.C., Chen L., (2006): Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:10660-5

Vielkind, U., Swierenga, S.H., (1989): A simple fixation procedure for immunofluorescent detection of different cytoskeletal components within the same cell, *Histochemistry*, 91: 81-88.

- Vodermaier H.C., (2004): APC/C and SCF: Controlling Each Other and the Cell. Cycle Curr. Biol., 14: 787-796.
- Vukušić K., Buđa R., (2016): Dissection of microtubule bundles in mitotic spindle using femtosecond laser ablation, (rukopis)
- Walczak C. E., Cai S., Khodjakov A. (2010): Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11: 91-102.
- Welburn J. P. I., Vleugel M. M., Liu D., Yates J. R., Lampson M. A., Fukagawa T., Cheeseman I. M. (2010): Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. Mol. Cell 38: 383– 392.

7. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivana Ponjavić

Datum i mjesto rođenja: 10.11.1994., Ozimica, BiH

Obrazovanje:

2013. – 2018. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije,
Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2009. – 2013. Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb

Sudjelovanja i priznanja:

2016. 9. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2017. 10. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2018. 11. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka