

# Proučavanje sila odgovornih za pozicioniranje kromosoma tokom diobe ljudskih stanica

---

Perković, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:444136>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
FIZIČKI ODSJEK

Ivana Perković

PROUČAVANJE SILA ODGOVORNIH ZA  
POZICIONIRANJE KROMOSOMA TOKOM  
DIOBE LJUDSKIH STANICA

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
FIZIČKI ODSJEK

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
FIZIKA SMJER: NASTAVNIČKI

**Ivana Perković**

Diplomski rad

**Proučavanje sila odgovornih za  
pozicioniranje kromosoma tokom diobe  
ljudskih stanica**

Voditelj diplomskog rada: Prof. dr. sc. Nenad Pavin

Ocjena diplomskog rada: \_\_\_\_\_

Povjerenstvo: 1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Datum polaganja: \_\_\_\_\_

Zagreb, 2022.

Veliko hvala izv.prof.dr.sc. Nenadu Pavinu na mentorstvu, prenesenom znanju, podršci i što je jedan od onih profesora koji vas motiviraju i inspiriraju. Zahvaljujem se i mag.phy. Domagoju Božanu na pomoći prilikom pisanja koda i udijeljenim savjetima.

Zahvaljujem se ekipi "Ljubičaste lete", kolegama i svim prijateljima jer ste mi uljepšali sve ove godine studiranja. Velika zahvalnost i mojim kolegama s posla na razumijevanju i strpljenju te posebno hvala mom Patricku.

Najveća hvala mojoj obitelji jer je najbolja na svijetu! Posebno hvala mom Matiji jer bez njegove podrške ne bi uspjela.

## Sažetak

Stanična dioba je esencijalni proces kontinuiteta života. Tokom stanične diobe formira se diobeno vreteno koje je odgovorno za ispravnu podjelu genetskog materijala na novonastale stanice kćeri. Diobeno vreteno kao aktivan element mitoze sadrži mikrotubule, motorne proteine te različite dodatne proteine čija je uloga ključna u samom formiranju diobenog vretena kao i pravilnom pozicioniranju kromosoma koje rezultira uspješnom podjelom genetskog materijala. Spomenuti elementi generiraju sile, koje će se koristiti za opisivanje mehanizma poravnanja kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena. U ovom diplomskom radu proučavan je model koji razmatra sile interakcije kinetohornih i premosnih mikrotubula, gdje su premosni mikrotubuli definirani kao mikrotubuli koji se protežu između sestrinskih kinetohora. Dodatne sile koje su proučavane uključuju sile generirane od strane motornih proteina i pasivnih vezivnih proteina na područjima antiparalelnih, odnosno paralelnih preklapanja premosnih i kinetohornih vlakana, interakciju kinetohora s mikrotubulima te ravnotežne sile između sestrinskih kinetohora.

# **Study of the forces responsible for the positioning of chromosomes during human cell division**

## **Abstract**

Cell division is an essential process of life continuity. During cell division, a mitotic spindle is formed, which is responsible for the correct division of genetic material into newly formed daughter cells. The spindle, as an active element of mitosis, contains microtubules, motor proteins and various additional proteins whose role is crucial in the formation of the spindle itself, as well as in the proper positioning of chromosomes, which results in the successful division of genetic material. The mentioned elements generate forces, which will be used to describe the mechanism of chromosome alignment on the equatorial plane of the mitotic spindle. In this thesis we use a model that considers the interaction forces of kinetochore and bridging microtubules, where bridging microtubules are defined as microtubules that extend between sister kinetochores. Additional forces that were studied include forces generated by motor proteins and passive crosslinkers at the areas of antiparallel and parallel overlaps of bridging and kinetochore fibers, kinetochore interaction with microtubules, and equilibrium forces between sister kinetochores.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Stanični ciklus.....	2
1.2 Mikrotubuli .....	4
1.3 Motorni proteini.....	8
2 Sile odgovorne za poravnanje kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena tokom diobe ljudskih stanica .....	11
3 Teorijski model .....	13
4 Rezultat modela.....	17
4.1 Aproksimacije modela .....	17
4.2 Brzine kinetohornih mikrotubula i kinetohora.....	18
4.3 Riješenje modela za realističan broj kinetohornih mikrotubula kod ljudskih stanica	21
4.4 Disproporcija broja kinetohornih mikrotubula s lijeve i desne strane modela .....	24
5 Zaključak.....	28

## 1. Uvod

Kontinuitet života ovisi o staničnoj proliferaciji te ključno o pravilnoj podjeli kromosoma koja je posredovana diobenim vretenom satkanim od mikrotubula te brojnih pripadnih esencijalnih proteina. Tijekom metafaze kromosomi se gibaju sve do poravnanja na ekvatorijalnoj ravnini. Pravilnim poravnanjem kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena posljedično dolazi do nastanka dvije stanice kćeri od kojih svaka zadržava isti genetski materijal upakiran u kromosome. Neuspjelo poravnanje dovodi do odgode ili prekida mitoze koje je regulirano kontrolnom točkom diobenog vretena (*eng. spindle assembly checkpoint, SAC*). Ako se položaj ne ispravi, stanice mogu slijediti nekoliko nepovoljnih scenarija. Može doći do stanične smrti, ali mogu i pretrpjeti različite vrste abnormalnosti što dovodi do stvaranja aneuploidnog potomstva [1]. Ipak, potpuno shvaćanje ovog fundamentalnog procesa još uvijek nedostaje te pruža jaku biološku motivaciju za proučavanje.

Kako bi se što bolje shvatio mehanizam poravnanja kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena nužno je sagledati aktivne elemente mitoze te njihove interakcije, odnosno sile kojima djeluju kroz ovaj proces. Gibanje kromosoma koje vodi do poravnanja, vođeno je silama kinetohornih mikrotubula koje vuku kinetohore prema pripadnim polovima diobenog vretena te polarnom silom izbačaja vršenom od strane ne-kinetohornih mikrotubula koji guraju ruke kromosoma od pripadnih polova [2]. Uloge spomenutih sila pri gibanju kromosoma su istražene u brojnim teorijskim studijama [3]. Glavni mehanizam poravnanja kromosoma u takvim modelima temeljen je na polarnim silama izbačaja koje imaju centrirajući efekt na kromosome s obzirom da opadaju s udaljenošću od pola diobenog vretena [4]. Takvi modeli nisu dali potpunu sliku sila koje djeluju na kromosome, stoga je fokus ovog rada na interakciji između premosnih i kinetohornih vlakana.

U ovom diplomskom radu proučavan je *flux-driven centering* model koji se oslanja na mehanizam centriranja proučavan u nedavnom radu [5]. Model koji je predložen u diplomskom radu proučava kinetohorno vlakno opisano realističnim brojem mikrotubula, koji u ljudskim stanicama može varirati od 5-20, dok je u navedenom radu samo jedan mikrotubul sačinjavao kinetohorno vlakno. Mehanizam centriranja temeljen je na silama na kinetohore

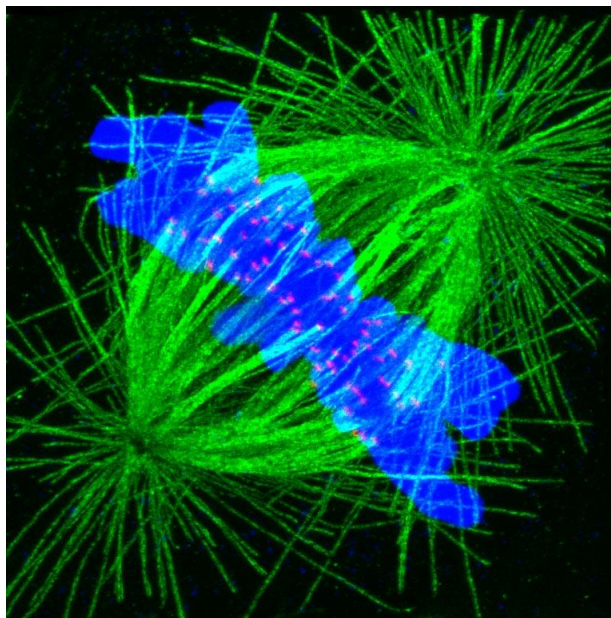


generiranim u preklapanjima kinetohornih vlakna i premosnih vlakana, a koje koje ovise o duljini preklapanja spomenutih vlakana. Model je proširen na način da je razmatran utjecaj realističnog broja mikrotubula koji sačinjavaju kinetohorna vlakna kod ljudskih stanica na preciznost i brzinu centriranja kromosoma.

### ***1.1 Stanični ciklus***

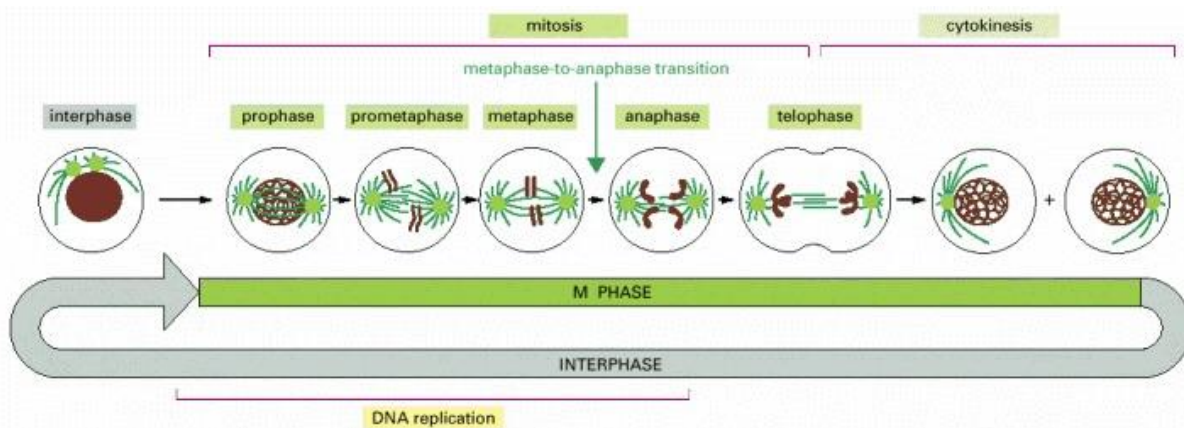
Najosnovnija funkcija staničnog ciklusa je udvostručenja i podjele genetskog materijala, a takva se podjela u kulturama ljudskih stanica dogodi otprilike svaka 24h [6]. Stanični ciklus dijelimo na četiri faze: G1 (G od engl. gap), S (S od engl. DNA synthesis), G2 te M faza (M od engl. mitosis). Stanica 95% svog ciklusa provodi u interfazi, gdje se tokom S faze DNK replicira, a tokom G-faza stanica raste te se sprema za sljedeću fazu, posebno u G2 se sintetiziraju proteini potrebni za mitozu.

U M fazi dolazi do segregacije kromosoma i stanične diobe a sam proces traje manje od sat vremena. Mitoza započinje kondenzacijom DNK (profaza), nuklearna ovojnica kao i stanični mikrotubuli se potom razgrađuju (prometafaza) te kreće reorganizacija stanice u diobeno vreteno. Diobeno vreteno se sastoji od mikrotubula, kromosoma i raznih pomoćnih proteina [7]. Centrosomi koji se nalaze na suprotnim polovima vretena generiraju nove mikrotubule koji interagiraju dajući specifičan oblik vretenu što je vidljivo na slici 1.1, te preko kinetohora hvataju replicirane kromosome, od kojih se svaki sastoji od para sestrinskih kromatida.



**Slika 1.1:** Mikroskopska slika diobenog vretena za vrijeme metafaze. Mikrotubuli (zelena boja) se protežu od dva pola prema periferiji i prema kromosomima (plava boja) s kojima su povezani preko kinetohora (ružičasta boja). Preuzeto s Wikipedie.

Zahvaljujući dinamičkim svojstvima mikrotubula, kromosomi se poravnavaju na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena u metafazi što je ujedno i obilježje mitoze te je važno za pravilan završetak mitoze [8]. Razdvajanje sestrinskih kromatida događa se u anafazi, tijekom koje se one gibaju djelovanjem motornih proteina i depolimerizacijom mikrotubula prema suprotnim polovima vretena što ujedno i produljuje stanicu. U telofazi dolazi do razgradnje diobenog vretena, formiraju se dvije nove jezgre, po jedna za svaki set kromosoma kao i ostali stanični organeli, a kromosomi se dekonenziraju. Općenito podjela cijele stanice se još naziva citokineza (*engl. cytoplasmic division*). Kao rezultat nastaju dvije stanice kćeri s jednakim genetskim materijalom koje su spremne za svoj vlastiti stanični ciklus. Primjer staničnog ciklusa prikazan je na slici 1.2 [15].



**Slika 1.2:** Shema staničnog ciklusa s naglaskom na mitozu i citokinezu, koji zajedno čine M fazu. Vidljivo je svih pet faza mitoze: profaza (kondenzacija DNK), prometafaza (reorganizacije stanice u diobeno vreteno), metafaza (poravnanje korosoma na ekvatorijalnoj ravni diobnog vretena), anafaza (razdvajanje sestrinskih kromatida) i telofaza (dekondenzacija kromosoma, formiranje jezgrine ovojnice). Nagla promjena biokemijskog stanja stanice događa se na prijelazu iz metafaze u anafazu [15].

## 1.2 Mikrotubuli

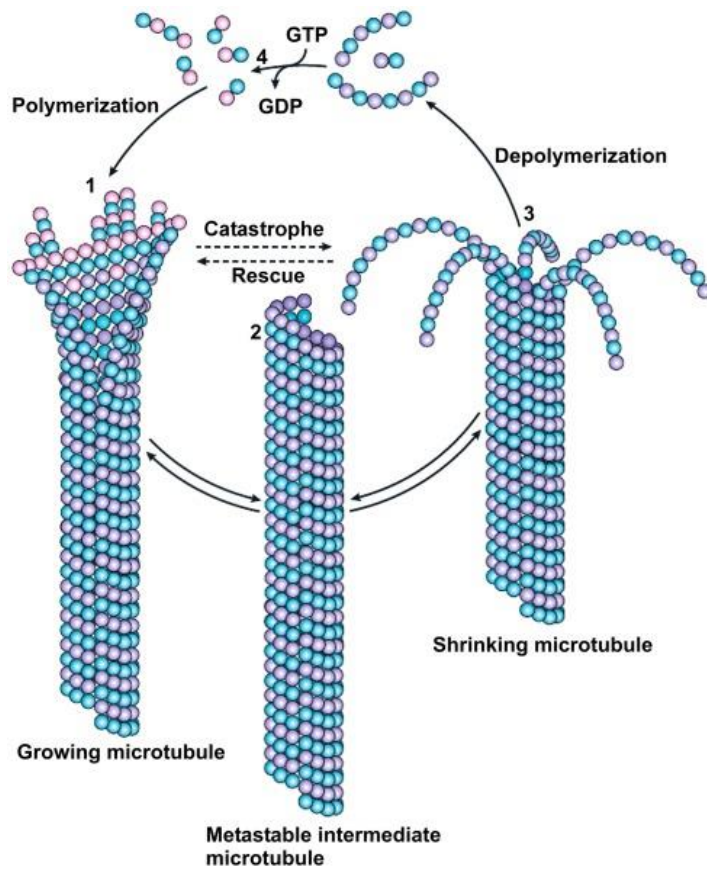
Stanice su organizirane i oblikovane pomoću niza tankih bjelančevinastih cjevčica i vlakana koje zajednički nazivamo citoskelet. Istaknute su 3 skupine filamenata: aktinski filamenti, intermedijalna vlakna i mikrotubuli.

Treća glavna komponenta citoskeleta, mikrotubuli, mogu se opisati kao krute, šuplje cjevčice vanjskog promjera oko 25 nm, te ih upravo taj oblik čini anizotropnima. Iako su kruti, mogu se malo savijati i slabo se rastežu pod utjecajem vučnih sila u smjeru protezanja. Velika čvrstoća (tri reda veličine veća nego kod aktina) im daje veliku postojanost i sposobnost da zadrže svoj oblik. Nadalje, i možda još važnije, krutost mikrotubula na savijanje omogućuje im da zadrže određeni smjer preko cijele stanice ili barem njenog velikog dijela [25].

Mikrotubuli su dinamičke strukture koje neprestano rastu ili se skraćuju, odnosno polimeriziraju i depolimeriziraju unutar stanice. Oni imaju ulogu u nizu staničnih kretanja, uključujući neke vrste stanične pokretljivosti, unutarstanično kretanje organela i diobu kromosoma tijekom mitoze, uz određivanje oblika stanice. Zahvaljujući svojoj građi mikrotubuli imaju svojstvo dinamičke polarnosti. Samo jedna vrsta globularnog proteina,

poznata kao tubulin, u polimernoj formi gradi mikrotubule. Dva polipeptida  $\alpha$ -tubulin i  $\beta$ -tubulin snažno se vežu nekovalentnim vezama u dimer. Treći oblik tubulina, poznat kao  $\gamma$ -tubulin, lokaliziran na centrosomu, neophodan je za sintezu mikrotubula. Dimeri tubulina se polimeriziraju te formiraju specifičnu cilindričnu šuplju strukturu pri čemu sudjeluje obično oko 13 linearnih protofilamenata. Nizovi dimera tubulina koji čine protofilamente organizirani su paralelno te usmjerenog slaganja. Kao rezultat toga, mikrotubule su polarne strukture s dva specifična kraja: plus krajem koji brzo raste i minus krajem koji raste sporo, pri čemu je  $\beta$ -tubulin uvijek je okrenut prema plus kraju. Smjer kretanja duž mikrotubula u velikoj je mjeri određen ovim polaritetom [9].

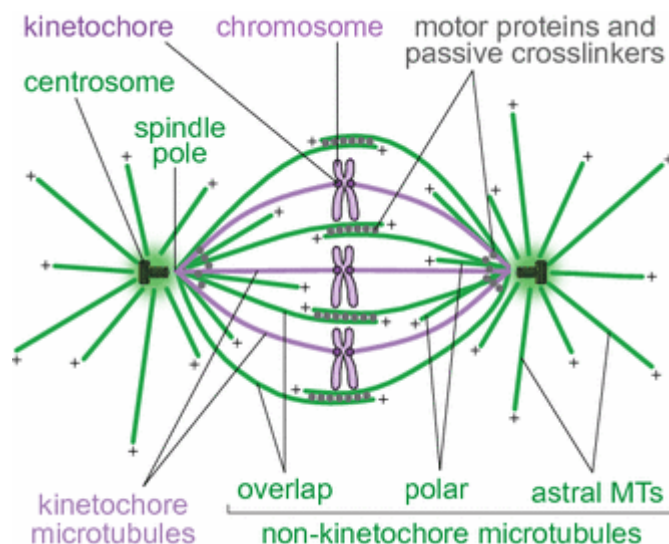
Polimerizacija odnosno depolimerizacija mikrotubula uvjetovana je vezanjem molekula GTP-a (*engl. Guanosine-5'-triphosphate*).  $\alpha$  i  $\beta$  tubulin vežu GTP. GTP vezan na  $\beta$ -tubulin tokom ili neposredno nakon polimerizacije hidrolizira do GDP-a (*engl. Guanosine diphosphate*) što čini daljnji proces vezanja tubulina na susjedne molekule manje povoljnim, te posljedično dolazi do depolimerizacije. GTP hidroliza uzrokuje ponašanje koje se još naziva dinamičkom nestabilnošću gdje individualne mikrotubule alterniraju između ciklusa rasta i skraćivanja. Dinamiku rasta odnosno skraćivanja mikrotubula određuje brzina dodavanja tubulina u odnosu na brzinu hidrolize GTP-a. Sve dok nove molekule tubulina dolaze brže na plus kraj nego što se GTP hidrolizira, rast mikrotubula se nastavlja. Međutim, ako se brzina polimerizacije uspori, GTP vezan za tubulin na plus kraju mikrotubula bit će hidroliziran u GDP. Ako se to dogodi, tubulin vezan za GDP će disociirati, što će rezultirati brзом depolimerizacijom mikrotubula. Vizual opisanih procesa se nalazi na slici 1.3.



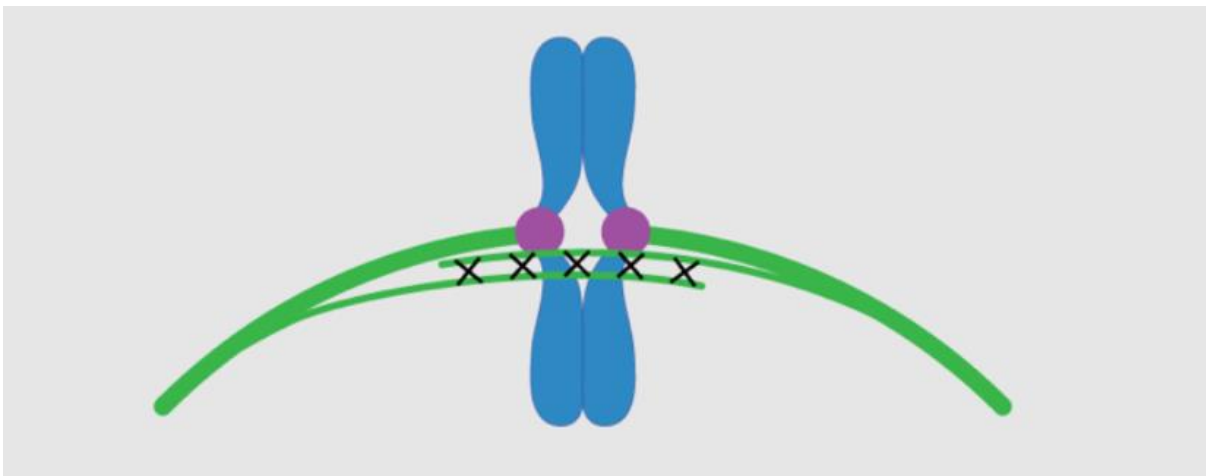
**Slika 1.3:** Shematski prikaz građe mikrotubula i njihove dinamike. S lijeva na desno, redom su prikazani proces rasta, mikrotubul u metastabilnom stanju, te proces skraćivanja. Ružičaste i ljubičaste kuglice shematski označavaju  $\beta$ -tubulin, a plave  $\alpha$ -tubulin. Jednostruki lanci kod skraćujućeg mikrotubula predstavljaju protofilamente [14].

Važnost dinamike mikrotubula posebno je istaknuta tokom mitoze gdje se oni kompletno reorganiziraju. Dolazi do disocijacije interfaznih mikrotubula, a slobodne podjedinice tubulina ponovno se formiraju kao aktivni element diobenog vretena šireći se iz centrosoma koje se nalaze na polovima diobenog vretena pri čemu je polarni kraj uvijek “-“. S obzirom na funkciju mikrotubula razlikujemo astralne, interpolarne i kinetohorne mikrotubule [10]. Astralni mikrotubuli pozicioniraju diobeno vreteno. Interpolarni mikrotubuli formiraju interpolarna vlakna šireći se svaki iz svog pola te se antiparalelno preklapaju i definiraju veličinu samog vretena. Kinetohorni mikrotubuli pozitivnim krajem se vežu na kinetohore, proteinske komplekse koji se nalaze na centromerama kromosoma te poravnavaju kromosome na ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena [11]. Jedno takvo

kinetohorno vlakno može brojati i oko 20-30 mikrotubula kao što je viđeno kod PTK stanica ovisno o fazi u kojoj se nalazi [12]. Kod HeLa stanica kinetohorno vlakno u metafazi sačinjava u prosjeku 17 mikrotubula [13]. Eksperimenti laserske ablacije ljudskih stanica pokazali su postojanje jake interakcije između kinetohornih vlakna i interpolarnih antiparalelnih mikrotubula skupnog naziva prenosni mikrotubuli. Premosni mikrotubuli, kao što je vidljivo na slici 1.5, djeluju kao most između sestrinskih kinetohornih vlakana, uravnotežuju međukinetohornu silu napetosti te igraju ulogu u poravnanju kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena [16][17][18].



**Slika 1.4:** Shematski prikaz diobenog vretena i funkcionalnih podskupina mikrotubula. Astralni mikrotubuli se šire iz centrosoma prema periferiji, interpolarni mikrotubuli se šire iz centrosoma prema središtu vretena, gdje u pojedinim slučajevima dolazi do antiparalelnih preklapanja, a kinetohorni mikrotubuli se također protežu od polova te se spajaju na kromosome preko kinetohora. U preklapanjima se nalaze motorni proteini i pasivni vezni proteini [19].



**Slika 1.5:** Shematski prikaz nekkih elemenata diobenog vretena. Premosna vlakana (tanka zelena linija) povezuju sestrinska kinetohorna vlakna (deblja zelena linija) koja su pričvršćena na kromosom (plavo) preko kinetohora (ljubičasto). U preklapanjima premosnih vlakana nalaze se motorni proteini (crni križići).

### 1.3 *Motorni proteini*

Mikrotubuli svoju biološku ulogu, uključujući generiranje sila, obavljaju uz pomoć motornih proteina i drugih proteina koji se vežu na mikrotubule. Pokazano je da mikrotubuli mogu nukleirati, rasti i skraćivati se u otopinama koje sadrže samo tubulin i GTP, no proteini povezani s mikrotubulima (*eng. microtubule associated proteins, MAP*) pomažu pri regulaciji nukleacije, umrežavanja i transporta mikrotubula. Posebno u diobenom vretenu, ti proteini pomažu definirati geometriju, lokaciju, orijentaciju te dinamiku vretena [20].

Motorni proteini spadaju u skupinu proteina koji kemijsku energiju pretvaraju u mehanički rad. Poznate su tri skupine motornih proteina odgovornih za usmjerena gibanja na mikrotubulima i aktinskim filamentima, pri čemu se miozinski motori kreću po aktinskim filamentima, dok se kinezinski i dineinski motori kreću po mikrotubulima. Ovim gibanjima, proteini doprinose unutarstaničnoj organizaciji i prijenosu unutarstaničnih komponenti. Uloga kinezina i deina je regulacija dinamike mikrotubula, prijenos tereta po mikrotubulima i organizacija mikrotubula u strukturu diobenog vretena, pri čemu se dineini kreću prema minus kraju, dok kinezini uglavnom prema plus kraju mikrotubula [21]. Proteinska domena je dio polipeptidnog lanca koji obavlja neku kemijsku ili fizikalnu funkciju, a u razmatranju kretanja proteina po mikrotubulima bitna je motorna domena. Položaj motorne domene na početku, sredini ili kraju lanca definira kinezine klase N, M i C, a njihovo kretanje duž mikrotubula

može se ispitati korištenjem in vitro testova motiliteta. Ove tri klase sastoje se od mnogih potklasa. Konvencionalni kinezin je kinezin N klase (potklasa N1) koji ima motornu domenu na N-kraju teškog lanca. Mikrotubule imaju strukturni polaritet i svi do sada ispitani kinezini klase N kreću se prema plus kraju mikrotubula, dok se motori klase C kreću prema minus kraju [26].

Svaki rad zahtjeva utrošak energije, a motorni proteini to ostvaruju pomoću kemijske energije hidrolize molekula ATP-a u mehaničku energiju koja naposljetku stvara snagu i usmjereno gibanje, no oni se mogu i pasivno gibati duž mikrotubula procesom difuzije. Kinezini i deini odrade stotinu ciklusa ATP hidrolize duž mikrotubula [22]. Gibanje ovih motornih proteina po mikrotubulu može se zamisliti kao “koračanje“. Koračanje se sastoji od sitnih ponavljajućih koraka pri čemu se domene motornih glava povezuju i razvezuju s vlakna. Kemijski gledano pri svakom takvom koraku se dogodi hidroliza molekule ATP-a do ADP-a i fosfatne skupine. Kako bi se motor mogao vezati na mikrotubul, mora sniziti energiju, a to čini ispuštanjem fosfatne skupine, pri čemu mu ostaje ADP. Potom motor ispušta i ADP, a kemijski proces prati i konformacijska promjena. Ispuštanjem molekule ADP-a, koljeno motora se savija, a kemijska energija pretvorena je u mehanički rad. Motor potom veže ATP iz citoplazme pa se odvaja od vlakna, te ponovnom hidrolizom koljeno se ispravlja.

S obzirom na to da motorni proteini povezuju kemijske reakcije i izvođenje mehaničkog rada, napravljen je niz in vitro eksperimenata i teorijskih studija da bi se objasnila ova veza [27] [28]. U in vitro eksperimentima, u kojima su korištene otopine koje sadrže pročišćeni tubulin i motorni protein kinezin-1, proučavano je koliku silu može proizvesti ovaj motorni protein dok se kreće duž mikrotubula. Opaženo je da slobodni motorni protein putuje određenom brzinom,  $v$ , koja se smanjuje što je veća sila,  $f$ , koja se suprotstavlja gibanju proteina. Također je opaženo da kod određene sile, koja se naziva zaustavna sila, motorni protein se prestaje gibati. Opisani je odnos poznat kao relacija sila-brzina, koja ima nelinearnu ovisnost. Iz praktičnih razloga često se u teorijskim modelima ta ovisnost aproksimira linearnom funkcijom,

$$v = v_0 \left( 1 - \frac{f}{f_0} \right) \quad (2.1)$$



Ako na motorni protein ne djeluje sila ili je ona okomita na smjer mikrotubula, motorni protein će se kretati konstantnom brzinom. U ovom izrazu  $v_0$  predstavlja brzinu gibanja motornog proteina bez djelovanja sile, dok  $f_0$  predstavlja zaustavnu silu.

## 2 Sile odgovorne za poravnanje kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena tokom diobe ljudskih stanica

U ovom diplomskom radu koristi se model koji opisuje mehanizam centriranja temeljen na silama vršenih od strane kinetohornih vlakna na kinetohore koje ovise od duljini preklapanja premosnih i kinetohornih vlakana [5]. Premosna vlakna bočnim preklapanjima djeluju na kinetohorna vlakna preko motornih i pasivnih vezivnih proteina. Preklapanja mogu biti paralelna gdje su kinetohorni i premosni mikrotubuli istog usmjerenja, a tada su glavni nosioci sile motorni proteini. U slučaju antiparalelnog preklapanja, kinetohorni i premosni mikrotubuli polimeriziraju u suprotnim smjerovima te silu generiraju pasivni vezivni proteini.

Pri razmatranju spomenutih interakcija, kinetohore u modelu izmaknemo nekoliko mikrometara u lijevo od ekvatorijalne ravnine diobenog vretena te promatramo kako se njihova pozicija mijenja u vremenu. U početnom trenutku lijevo kinetohorno vlakno je kraće nego desno sestrinsko, te samim tim i duljine preklapanja kinetohornih i premosnih vlakana su na lijevoj strani kraće nego na desnoj. Posljedično koncentracija motornih i pasivnih vezivnih proteina akumuliranih u preklapanjima generira centrirajuću silu na kinetohore, što je upravo i posebnost ovog modela. Dulje kinetohorno vlakno podliježe toku pri većoj brzini nego kraće jer ima veći broj akumuliranih motornih proteina koji su nosioci sile. Brži tok duljeg kinetohornog vlakna vuče kinetohore u smjeru tog vlakna, tj. prema ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena. Stoga, temeljna ideja ovog modela je da su kinetohore centrirane vučnim silama proporcionalnim duljinama preklapanja kinetohornih i premosnih vlakana. Motorni proteini akumulirani u antiparalelnim preklapanjima generiraju silu koja klizajući odvaja premosne i kinetohorne mikrotubule prema,

$$F_m = Dn_m f_m M \quad (2.1)$$

gdje je  $D$  duljina antiparalelnog preklapanja,  $n_m$  koncentracija motornih proteina,  $f_m$  sila jednog motornog proteina i  $M$  broj mikrotubula koji sačinjavaju kinetohorno vlakno. Slično, pasivni vezni proteini u paralelnim preklapanjima kinetohornih i premosnih mikrotubula generiraju ukupnu silu,

$$F_c = Ln_c f_c M \quad (2.2)$$

proporcionalnu duljini paralelnog preklapanja  $L$ , koncentraciji pasivnih veznih proteina  $n_c$  i sili koju vrši pojedini pasivni vezni protein. Sile generirane od strane motornih proteina na kinetohorna vlakna su oprečne silama na kinetohorama,  $F_{KC}$ , i silama pasivnih veznih proteina,

$$F_m = F_{KC} + F_c \quad (2.3)$$

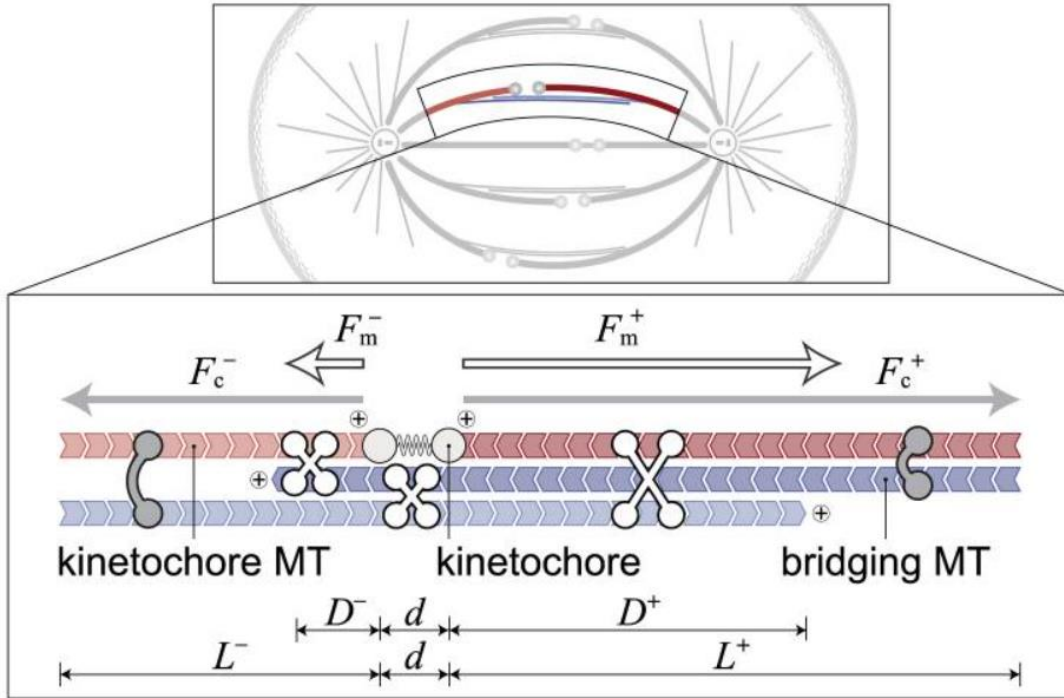
Dodatne interakcije koje su razmatrane su interakcije između premosnih mikrotubula i sile između kinetohora, koje će biti detaljnije raspisane u sljedećem poglavlju.

### 3 Teorijski model

U ovom diplomskom radu proučavan je *flux-driven centering* model koji je predložen u radu [5]. Također, model je proširen na način da je kinetohorno vlakno opisano realističnim brojem mikrotubula, koji može varirati od 5-20, dok je u navedenom radu samo jedan mikrotubul sačinjavao kinetohorno vlakno.

Model koji se koristi za proučavanje sila se sastoji od dvije sestrinske kinetohore, dva sestrinska kinetohorna vlakna od kojih svaki sadrži po jedan mikrotubul, koji se šire iz suprotnih polova vretena do kinetohora i dva premosna mikrotubula koji se preklapaju međusobno i s kinetohornim mikrotubulima oko središta, što je vidljivo na slici 3.1. Kako bi se istražila ključna svojstva mehanizma centriranja, kinetohore u modelu su pomaknute za  $2\mu\text{m}$  u lijevo od ekvatorijalne ravnine diobenog vretena, te je pročavan njihov povratak u ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena, što ujedno definiramo kao ishodište.

Sustav dijelimo na lijevu i desnu stranu s obzirom na točku koja označava polovinu udaljenosti između kinetohora te pripadno elemente lijeve strane nadalje označavamo s “-“, a elemente desne strane s “+“. Pozicije sestrinskih kinetohora stoga su jedinstveno označene kao  $x_{KC}^-$ , tj.  $x_{KC}^+$ . Općenito, možemo zapisati pozicije elemenata kao  $x_i^\pm$ , za  $i = KC, kMT, bMT$  gdje  $KC$  označava kinetohoru,  $kMT$  kinetohorni mikrotubul i  $bMT$  premosni mikrotubul. Duljina diobenog vretena označena je  $L_0$ , a ukupna duljina preklapanja između premosnih mikrotubula s  $D_0$ . Konačan cilj je doći do izraza za brzine pojedinih elemenata, što će nam daljnjim računom dati i konačne pozicije. Pozicije elemenata se mijenjaju u vremenu  $t$ , pa možemo izračunati njihove brzine kao  $v_i^\pm = dx_i^\pm/dt$ .



**Slika 3.1:** Shematski prikaz diobenog vretena (gore) i shema modela (dolje). Kinetohorni mikrotubuli (crveno) se protežu od centromera do elastično spojenih kinetohora (bijele kružnice povezane oprugom). Premosni mikrotubuli (plavo) se šire od rubova i preklapaju u središnjem dijelu. Motorni proteini (bijeli X-oblik) protežu se duž antiparalelnih preklapanja mikrotubula, a pasivni vezni proteini (sivi elementi C-oblika) duž paralelnih. Model je podijeljen na lijevu (-) i desnu (+) stranu s obzirom na polovicu udaljenosti između kinetohora [5].

Interakcija između sestrinskih kinetohora aproksimirana je Hookeovom oprugom pa je sila međudjelovanja  $F_{el} = k(x_{KC}^+ - x_{KC}^- - x_0)$ , gdje je  $k$  elastični koeficijent opruge, a  $x_0$  duljina opruge pri mirovanju. Interakcija kinetohora i plus kraja mikrotubula opisana je sa  $F_{KC}^\pm = -\mu_{KC}(v_{KC}^\pm - v_{kMT}^\pm)$ , gdje  $\mu_{KC}$  označava koeficijent trenja na kinetohori [23]. Također  $F_{KC}^+ = F_{KC}^-$ . Opisane sile su ujedno i jedine sile koje djeluju na kinetohore te se one uravnoteže,

$$F_{KC}^\pm = \pm F_{el} \quad (3.1)$$

Motorni proteini u antiparalelnim preklapanjima kinetohornih i premosnih mikrotubula djeluju na kinetohorna vlakna silom  $F_m^\pm$  koja usmjerava njihovo gibanje kojem se opiru sile generirane od strane pasivnih veznih proteina  $F_c^\pm$  i sila na kinetohorama,

$$F_m^\pm - F_c^\pm - F_{KC}^\pm = 0 \quad (3.2)$$

Broj motornih proteina raspoređenih duž preklapanja kinetohornih i premosnih vlakana dan je kao,

$$N_m^+ = n_m D^+ M^+ \quad (3.3)$$

$$N_m^- = n_m D^- M^- \quad (3.4)$$

Pri čemu  $n_m$  označava gustoću motornih proteina,  $D^+, D^-$  duljine antiparalelnih preklapanja i  $M^+, M^-$  broj mikrotubula lijeve i desne strane modela. Kako bi matematički osigurali da preklapanja postoje iskoristit ćemo Heaviside step funkciju  $\theta(\frac{D_0}{2} \mp x_{KC}^\pm)$ , pri čemu  $D^\pm = (\frac{D_0}{2} \mp x_{KC}^\pm) \theta(\frac{D_0}{2} \mp x_{KC}^\pm)$ . Kombiniranjem jednadžbi (2.1), (3.3) i (3.4), imamo izraz sile za lijevu i desnu stranu modela  $F_m^\pm = N_m^\pm f_m^\pm$ . Sila jednog motora ovisi o relativnoj brzini kinetohornog i premosnog vlakna koji se gibaju u suprotnim smjerovima kao  $f_m^\pm = f_0[\pm 1 - (v_{kMT}^\pm - v_{bMT}^\mp)/v_0]$ , pri čemu  $f_0$  označava zaustavnu silu, a  $v_0$  brzinu bez tereta.

Pasivni vezni proteini u paralelnim preklapanjima kinetohornih i premosnih mikrotubula generiraju ukupnu silu prema jednadžbi (2.2), koja raspisana s obzirom na lijevu i desnu stranu sustava postaje  $F_c^\pm = n_c L^\pm M^\pm f_c^\pm$ .  $f_c^\pm$  označava silu jednog pasivnog veznog proteina te je proporcionalna koeficijentu trenja pasivnog veznog proteina i relativnoj brzini između kinetohornih i premosnih mikrotubula  $f_c^\pm = \mu_c(v_{kMT}^\pm - v_{bMT}^\mp)$ . Broj pasivnih veznih proteina je,

$$N_c^+ = n_c L^+ M^+ \quad (3.5)$$

$$N_c^- = n_c L^- M^- \quad (3.6)$$

gdje  $n_c$  označava linearnu gustoću pasivnih veznih proteina raspoređenih po paralelnim preklapanjima premosnih i kinetohornih vlakana te je duljina preklapanja definirana preko duljine kinetohornog vlakna  $L^\pm = \pm(\frac{L_0}{2} - x_{KC}^\pm)$ , gdje je  $L_0$  duljina diobenog vretena.

Posljednja interakcija koja se razmatra je između premosnih mikrotubula, a ona je generirana unutar antiparalelnih preklapanja premosnih mikrotubula od strane motornih

proteina te ovisi o razlici u brzinama između pojedinog mikrotubula, ukupnoj duljini antiparalelnog preklapanja i gustoći motora duž preklapanja,

$$F_{bMT} = n_m D_0 f_0 \left[ 1 - \frac{v_{bMT}^+ - v_{bMT}^-}{v_0} \right] \quad (3.7)$$

Ovoj sili se suprotstavlja ukupna sila motornih proteina  $F_m^\pm$  i ukupna sila pasivnih veznih proteina  $F_c^\pm$ ,

$$F_{bMT} \pm F_m^\mp \pm F_c^\pm = 0 \quad (3.8)$$

## 4 Rezultat modela

### 4.1 Aproksimacije modela

Uzmemo li u obzir relevantno vrijeme potrebno kromosomima, a samim time i kinetohorama da od početnog položaja dođu do ekvatorijalne ravnine diobenog vretena, možemo zanemariti razliku u brzinama kinetohora,  $\Delta v_{KC} = v_{KC}^+ - v_{KC}^- = 0$ . Dakle razmatrat ćemo gibanje kinetohora kao homogeno, odnosno kao da su povezane krutom oprugom. Interkinetohorna brzina ima približnu vrijednost  $\Delta v_{KC} \approx (x_{KC}^+ - x_{KC}^-)/t_c$ , gdje  $t_c = D_0/(v_{KC}^+ + v_{KC}^-)$ . Primjenom navedenih izraza na jednadžbu (3.1) dobije se,

$$\frac{\Delta v_{KC}}{v_{KC}^+ + v_{KC}^-} = \left[ \frac{2kD_0}{\mu_{KC}v_0} + \frac{v_{KC}^+ + v_{KC}^-}{v_0} \right]^{-1} \quad (4.1)$$

Gledajući parametre koji su specifični za diobeno vreteno ljudske stanice  $k = 100pN/\mu m$  [24],  $D_0 = 6\mu m$ ,  $v_0 = 4\mu m/min$ , imamo  $2kD_0/\mu_{KC}v_0 \gg 1$  pa desna strana jednadžbe (4.1) teži u 0.

Druga aproksimacija potiče od simetrije modela gdje obje strane imaju po jednak broj kinetohornih mikrotubula. Kod centriranih kinetohora, područja preklapanja lijeve i desne strane modela imaju jednake iznose duljine  $D^+ = D^-$ ,  $L^+ = L^-$ . Uvrstimo li navedene duljine u jednadžbu (3.8), dobijemo,

$$\frac{2v_{bMT}^+}{v_0} \left( 1 + \frac{N_c^+ \mu_c}{N_{bMT} f_0} \frac{v_0}{2} + \frac{D^+}{2D_0} \right) = 1 + \frac{N_c^+ \mu_c}{N_{bMT} f_0} v_{kMT}^+ - \frac{D^+}{D_0} \left( -1 - \frac{v_{kMT}^-}{v_0} \right) \quad (4.2)$$

Doprinos motornih proteina je dosta veći od doprinosa pasivnih veznih proteina tj.  $2N_{bMT}f_0 \gg N_c^+ \mu_c v_0$ , pa drugi član lijeve i drugi član desne strane možemo zanemariti. Slično  $D_0 \gg D^+$ , iz čega slijedi da se i treći članovi s obje strane jednakosti mogu zanemariti.

Konačno dobijemo  $\frac{2v_{bMT}^+}{v_0} = 1$ .



## 4.2 Brzine kinetohornih mikrotubula i kinetohora

Uzimajući u obzir navedene aproksimacije i primjenom istih na jednadžbu (3.2) pri čemu se uvrste i pripadni izrazi za sile, dobije se brzina kinetohornih mikrotubula. Također uvodimo

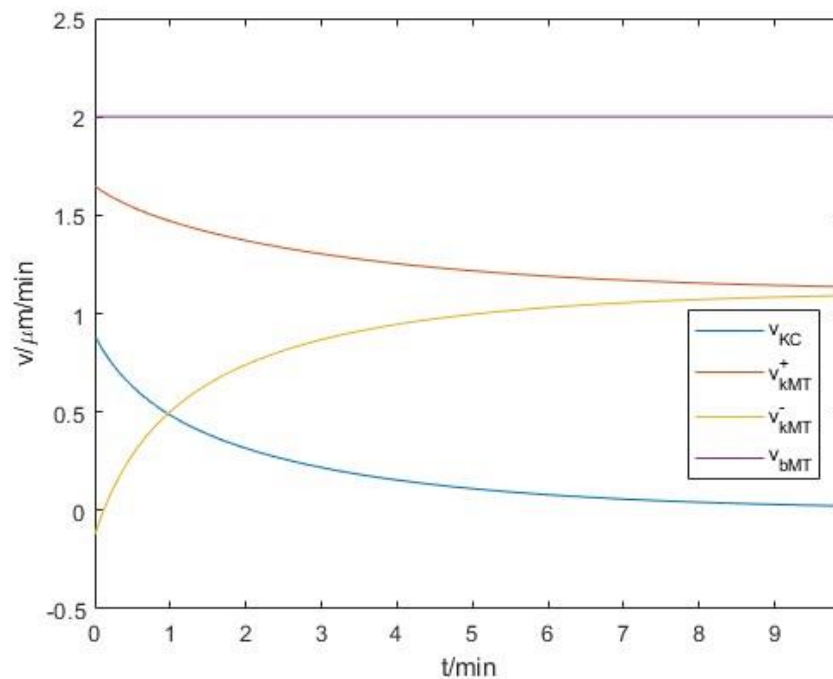
tri pokrate  $\alpha^\pm = \left(\frac{N_m^\pm f_0}{v_0} + \mu_{KC}\right)^{-1}$ ,  $g_c^\pm = N_c^\pm \mu_c$  i  $g_m^\pm = N_m^\pm f_0 / v_0$ . Konačno,

$$v_{kMT}^\pm = \alpha^\pm \left( \mu_{KC} v_{KC} \pm \frac{v_0}{2} (g_c^\pm + g_m^\pm) \right) \quad (4.3)$$

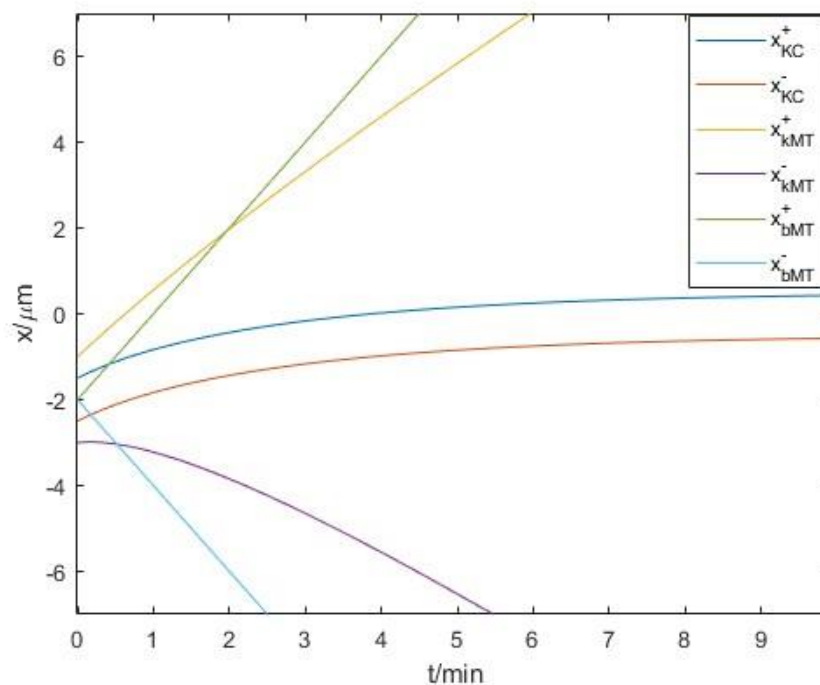
Kombinacijom jednadžbi (3.1) i (3.2) dobije se odnos sila između lijevog i desnog sestrinskog kinetohornog vlakna kao  $F_c^+ - F_m^+ = -F_c^- + F_m^-$ . Primjenom pripadnih izraza za odnos sile i brzine motornih proteina, sila koje generiraju pasivni vezni proteini i izraza za brzinu kinetohornog vlakna (3.9), te pazeći na vrijednosti istih s obzirom na lijevu i desnu stranu modela, dobije se končan izraz za brzinu kinetohora,

$$v_{KC} = \frac{v_0}{2\mu_{KC}} \frac{(g_c^+ + g_m^+)(1 - \alpha^+(g_c^+ + g_m^+)) - (g_c^- + g_m^-)(1 - \alpha^-(g_c^- + g_m^-))}{\alpha^+(g_c^+ + g_m^+) + \alpha^-(g_c^- + g_m^-)} \quad (4.4)$$

Do pozicija kinetohora dolazi se integracijom jednadžbe (4.4) po vremenu, budući da ona eksplicitno ovisi samo o geometriji sustava.



**Slika 4.1:** Graf ovisnosti brzine kinetohora (plavo), desnog kinetohornog mikrotubula (narančasto), lijevog kinetohornog mikrotubula (žuto) i prenosnog mikrotubula (ljubičasto) za rješenje modela u vremenu za parametre u tablici 4.1.



**Slika 4.2:** Graf ovisnosti položaja elemenata u ovisnosti o vremenu za rješenje modela za parametre u tablici 4.1 .

Parametri koji su korišteni za grafički prikaz rješenja za jednačbe 4.3 i 4.4 prikazani su u tablici 4.1. Vidimo da kada su kinetohore izmahnute od ekvatorijalne ravnine diobenog vretena, kraće kinetohorno vlakno se giba prema polu sporijom brzinom nego dulje, koje je odgovorno za kretanje kinetohora prema središtu vretena (slika 4.1). Brzina centriranja kinetohora se smanjuje kako se kinetohore približavaju središtu. Brži tok dužeg kinetohornog vlakana vuče kinetohore u smjeru ovog vlakna (tj. prema središtu vretena).

Parametri		Vrijednost	Izvor
Duljina diobenog vretena	$L_0 = L^- + d + L^+$	$14 \mu m$	[5]
Duljina preklapanja mikrotubula	$D_0 = D^- + d + D^+$	$6 \mu m$	[5]
Udaljenost između kinetohora	$d$	$1 \mu m$	[5]
Zaustavna sila klizajućih motora	$f_0$	$5 pN$	[17]
Brzina motornih proteina	$v_0$	$4 \mu m/min$	[5]
Gustoća motornih proteina	$n_m$	$10 \mu m^{-1}$	[5]
Broj kinetohornih mikrotubula	$M^- = M^+$	1	[5]
Umnožak koeficijenta trenja i gustoće pasivnih veznih proteina	$n_c \mu_c$	$1 pNmin/\mu m^2$	[5]
Efektivan koeficijent trenja na kinetohori	$\mu_{KC}$	$30 pNmin/\mu m$	[5]

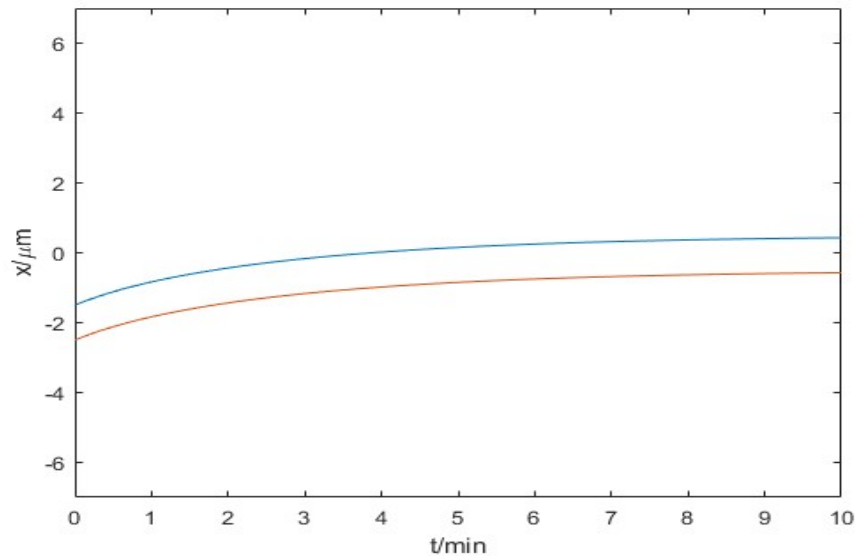
**Tablica 4.1:** Parametri korišteni u ovom radu.

### 4.3 Riješenje modela za realističan broj kinetohornih mikrotubula kod ljudskih stanica

U izvornom modelu je definirano da se sestrinska kinetohorna vlakna sastoje od po jednog kinetohornog mikrotubula. Model proširujemo gledajući realističnu situaciju kod ljudskih stanica gdje kinetohorno vlakno može sadržavati 5-20 kinetohornih mikrotubula.

Budući da su u izvornom modelu vrijednosti gustoće motornih proteina i umnoška koeficijenta trenja i gustoće pasivnih veznih proteina odabrane za optimalan režim centriranja, ovdje je bilo potrebno varirati spomenute veličine. Nove vrijednosti gustoće motornih proteina i umnoška koeficijenta trenja i gustoće pasivnih veznih proteina koje su korištene u daljnjem izračunu su:  $n_m = 1 \mu m^{-1}$  i  $n_c \mu_c = 0.1 \frac{pNmin}{\mu m^2}$ .

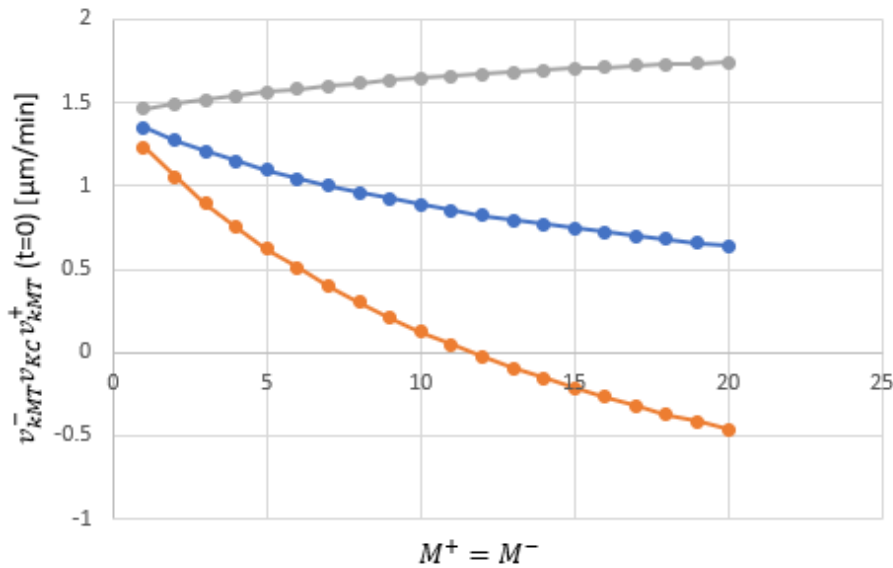
Analiziramo položaj kinetohora u vremenu relevantnom za poravnanje kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena kod ljudskih stanica, 10 minuta. Uvidom u već napisane jednačbe variramo  $M^+$  u jednačbama (3.3) i (3.5), odnosno  $M^-$  u jednačbama (3.4) i (3.6). Prvo smo ponovili izračun za  $M^+ = M^- = 10$



**Slika 4.3:** Ovisnost položaja lijeve (narančasto) i desne (plavo) kinetohore u vremenu za  $\frac{M^+}{M^-} = \frac{10}{10}$  i parametre u tablici 4.1. uz izmjenu za  $n_m = 1 \mu m^{-1}$  i  $n_c \mu_c = 0.1 \frac{pNmin}{\mu m^2}$ .

Usporedbom grafova ovisnosti pozicija kinetohora o vremenu za  $M^+ = M^- = 1$  (slika 4.2) sa  $M^+ = M^- = 10$  (slika 4.3), vidljivo je da smo dobili isti rezultat, odnosno konačna srednja pozicija kinetohora odgovara ishodištu sustava. Broj motornih proteina i broj pasivnih veznih proteina su proporcionalni broju kinetohornih mikrotubula  $a$ , posljedično prema  $F_m^\pm = N_m^\pm f_m^\pm$  i  $F_c^\pm = N_c^\pm f_c^\pm$ , ukupna sila koju generiraju motorni proteini i pasivni vezni proteini će biti  $n$  puta veća za  $n$  više mikrotubula. Odnos sila između lijevog i desnog sestrinskog kinetohornog vlakna,  $F_c^+ - F_m^+ = -F_c^- + F_m^-$  ostaju u proporciji te su posljedično i kromosomi poravnati na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena.

U nastavku smo promatrali kako se mijenjaju početne brzine kinetohora i kinetohornih mikrotubula u slučajevima za  $M^+ = M^-$  na način da smo varirali brojeve kinetohornih mikrotubula od 1 do 20.



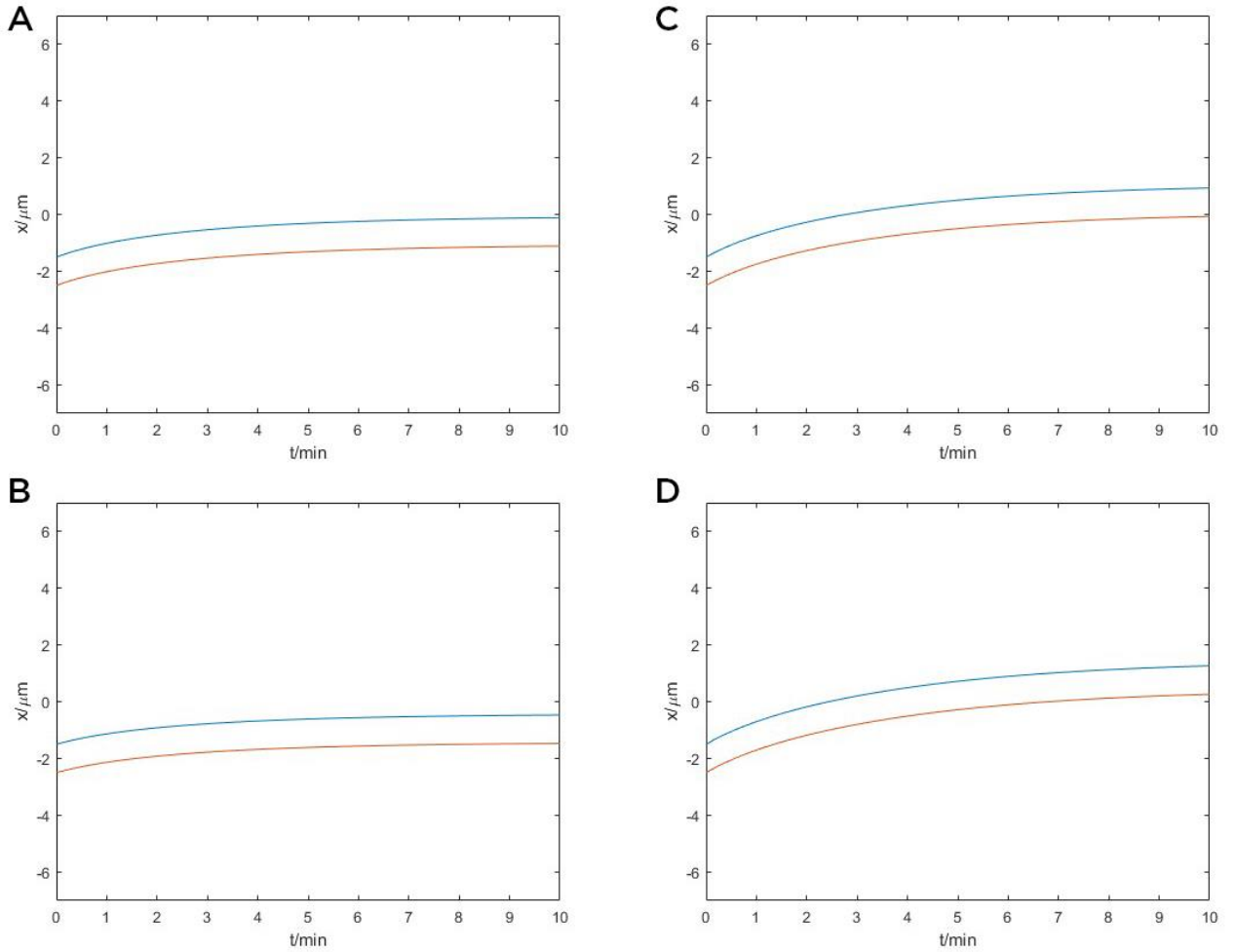
**Slika 4.4:** Ovisnost početnih brzina kinetohora (sivo), lijevog kinetohornog mikrotubula (narančasto) i desnog kinetohornog mikrotubula (sivo) o broju kinetohornih mikrotubula.

Iz slike 4.4. primjećujemo da za sve veći broj mikrotubula, početna brzina desnog kinetohornog mikrotubula raste a to je posljedica povećanja broja motora. Početna brzina kinetohora se smanjuje jer obje kinetohore akumuliraju sve veći broj motora. Početna brzina lijevog kinetohornog mikrotubula za manji broj mikrotubula, usmjerena je prema desno (pozitivna) što uzrokuje njegovo početno gibanje prema središtu (suprotno od lijevog pola)

kao što možemo primjetiti u izvornom modelu (slika 4.1). Kako raste broj kinetohornih mikrotubula taj efekt nestaje jer je sila dovoljno jaka da usmjeri gibanje kinetohornog mikrotubula odmah u lijevo pa su i početne brzine negativne.

#### 4.4 Disproporcija broja kinetohornih mikrotubula s lijeve i desne strane modela

Sada ćemo varirati broj kinetohornih mikrotubula tako da imamo različit broj s lijeve i desne strane modela te ponoviti račun kako bi vidjeli njihov utjecaj na mehanizam poravnania kromosoma. Broj mikrotubula koji sačinjavaju kinetohorno vlakno ćemo varirati za realne vrijednosti kod ljudskih stanica  $\frac{M^+}{M^-} = \frac{15}{10}, \frac{20}{10}, \frac{10}{15}, \frac{10}{20}$ . Za početne uvjete uzimamo da je pozicija kinetohora  $-2\mu\text{m}$  i  $t_0 = 0$ .

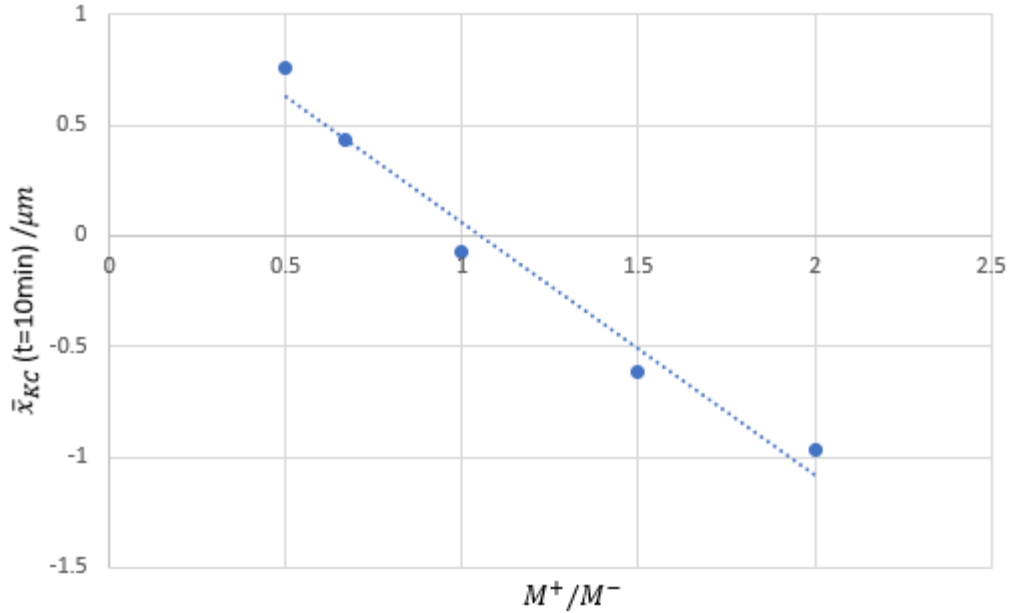


**Slika 4.5:** Ovisnost položaja lijeve (narančasto) i desne (plavo) kinetohore u vremenu za A)  $\frac{M^+}{M^-} = \frac{10}{15}$ , B)  $\frac{M^+}{M^-} = \frac{10}{20}$ , C)  $\frac{M^+}{M^-} = \frac{15}{10}$  i D)  $\frac{M^+}{M^-} = \frac{20}{10}$ . Ostali parametri su kao u tablici 4.1. uz izmjenu za  $n_m = 1 \mu\text{m}^{-1}$  i  $n_c \mu_c = 0.1 \frac{\text{pNmin}}{\mu\text{m}^2}$ .

Na slici 4.5 prikazane su ovisnosti položaja kinetohora o vremenu za 4 različite iteracije broja kinetohornih mikrotubula. U sva četiri slučaja nije došlo do pozicioniranja kinetohora na ishodištu u relevantnom vremenu, tj. izostalo je poravnanje kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena. Konačan položaj kinetohora s obzirom na ishodište, bio je otklonjen na stranu na koju smo uvrstili veći broj kinetohornih mikrotubula. U slučajevima A) i B) lijeva strana modela sadrži veći broj kinetohornih mikrotubula, konkretno u A)  $M^- = 15$ , B)  $M^- = 20$ , u odnosu na desnu stranu gdje je u oba slučaja  $M^+ = 10$ , te je konačan položaj kinetohora posljedično na lijevoj strani od ishodišta. Analogno, u slučajevima C)  $M^+ = 15$ ,  $M^- = 10$  i D)  $M^+ = 20$ ,  $M^- = 10$  pa je i konačan položaj kinetohora na desnoj strani modela s obzirom na ishodište. Usporedbom A) i B) vidimo da za veću disproporciju u broju kinetohornih mikrotubula s lijeve i desne strane modela otklon od ishodišta je to veći te analogno isti efekt primjećujemo i usporedbom slučajeva C) i D).

Ovaj rezultat nije iznenađujuć s obzirom na činjenicu da motorni i pasivni vezivni proteini akumulirani u preklapanjima generiraju centrirajuću silu na kinetohore. Ove sile rastu s duljinom preklapanja između premosnih i kinetohornih vlakna, no duljine preklapanja u svakom razmatranju su bile iste s obzirom da smo u početnom trenutku izmaknuli kinetohore za istu vrijednost, pa je ovaj efekt imao jednak doprinos za svaki slučaj. Povećanje broja kinetohornih mikrotubula u kinetohornom vlaknu omogućuje akumulaciju većeg broja proteina što rezultira i većom ukupnom silom,  $F_m^\pm \sim N_m^\pm \sim M^\pm$  i  $F_c^\pm \sim N_c^\pm \sim M^\pm$ .





**Slika 4.5:** Ovisnost konačnog srednjeg položaja kinetohora o omjeru  $M^+/M^-$  za,  $M^+/M^- =$

$$\frac{10}{20}, \frac{10}{15}, \frac{10}{10}, \frac{15}{10}, \frac{20}{10}$$

Slika 4.5 prikazuje ovisnost konačnog srednjeg položaja kinetohora  $\bar{x}_{KC} = \frac{x_{KC}^+ + x_{KC}^-}{2}$  o omjeru broja kinetohornih mikrotubule desne i lijeve strane modela,  $M^+/M^-$ . Odabrana je srednja vrijednost položaja kinetohora radi ljepšeg prikaza, a to smo mogli učiniti s obzirom na prvu aproksimaciju koju smo uveli gdje smo zanemarili razliku u brzinama između kinetohora. Ovaj prikaz je generalizacija slika 4.3 i 4.5, gdje puno bolje vidimo utjecaj disproporcije broja mikrotubula na mehanizam poravnanja.

Ukoliko svako sestrinsko kinetohorno vlakno sadrži jednak broj mikrotubula, u našem slučaju po deset, dolazi do poravnanja kinetohora na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena. Što je veća disproporcija u broju kinetohornih mikrotubula to će konačni položaj s obzirom na ishodište biti sve udaljeniji od ishodišta.

Također primjećujemo da otkloni u desno su većeg iznosa nego otkloni u lijevo za iste omjere kinetohornih mikrotubula, naprimjer  $\frac{M^+}{M^-} = \frac{M^-}{M^+} = \frac{20}{10}$ . Razlog tome je što su kinetohore u početnom trenutku izmaknute na poziciju  $-2\mu\text{m}$  pa je antiparalelno preklapanje s desne

strane dulje, a samim time i broj akumuliranih motornih proteina te posljedično imamo jaču silu i veći otklon.

## 5 Zaključak

Cilj ovog rada je bio proučiti sile odgovorne za pozicioniranje kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena tokom diobe ljudskih stanica. Kako bismo ih proučili, prvo smo razmatrali pojednostavljeni sustav koji se sastojao od dvije sestrinske kinetohore, dva sestrinska kinetohorna vlakna od kojih svaki sadrži po jedan mikrotubul, koji se šire iz suprotnih polova vretena do kinetohora i dva premosna mikrotubula koji se preklapaju međusobno i s kinetohornim mikrotubulima oko središta. Kinetohore, odnosno polovište njihove udaljenosti smo izmaknuli na poziciju  $-2 \mu m$  te promatrali dinamiku povratka u ishodište sustava. Kinetohore dođu do centra diobenog vretena u nekoliko minuta uzevši u obzir parametre specifične za vretena u ljudskim stanicama. Koristili smo *flux-driven centering* model koji je predložen u radu [5]. Postavili smo jednadžbe za sile interakcija između pojedinih elemenata diobenog vretena iz kojih smo daljnjim računom izveli izraze za brzine i položaje kinetohora, kinetohornih mikrotubula i premosnih mikrotubula. Jednadžbe za parametre navedene u tablici 4.1 smo riješili u programu MatLab te grafički prikazali rješenja modela gdje smo pokazali da brži tok dužeg kinetohornog vlakana vuče kinetohore u smjeru ovog vlakna odnosno prema središtu vretena. Rezultat je ujedno i potvrda *flux-driven centering* modela iz [5], odnosno da su sile generirane u antiparalelnim preklapanjima zaista odgovorne za poravnanje kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena.

U daljnjem računu razmatrane su iste interakcije, no za razliku od izvornog modela, uvrštene su realne vrijednosti broja mikrotubula koje sačinjavaju kinetohorno vlakno kod ljudskih stanica. Prvo smo riješili jednadžbe za realan broj mikrotubula tako da su oba sestrinska kinetohorna vlakna sadržavala po jednak broj. S obzirom da su sile generirane od strane motornih proteina i veznih pasivnih proteina proporcionalne broju proteina, te posljedično i broju kinetohornih mikrotubula, ukupna generirana sila na lijevoj strani modela i ukupna generirana sila na desnoj strani, povećava se za jednak iznos tako da je konačni rezultat isti, u što smo se i uvjerali usporedbom grafičkih rješenja za oba slučaja. Promatrali smo i kako se početne brzine kinetohornih mikrotubula i kinetohorna mijenjaju za različite brojeve mikrotubula gdje smo pokazali da za sve veći broj mikrotubula početna brzina kinetohora se smanjuju, dok početna brzina lijevog kinetohornog vlakna raste. Kod lijevog kinetohornog mikrotubula pokazali smo da za manji broj mikrotubula, početna brzina je usmjerena prema

desno (pozitivna) što uzrokuje njegovo početno gibanje prema središtu (suprotno od lijevog pola), a kako raste broj kinetohornih mikrotubula taj efekt nestaje jer je sila dovoljno jaka da usmjeri gibanje kinetohornog mikrotubula odmah prema lijevo.

Nadalje smo varirali broj mikrotubula na način da smo uvrštavali različite vrijednosti za lijevo i desno sestrinsko kinetohorno vlakno. Pokazali smo da u ovim slučajevima neće doći do centriranja već će konačna pozicija biti izmaknuta na stranu koja sadrži veći broj kinetohornih mikrotubula s obzirom na ishodište. Također, primijetili smo da što je disproporcija broja mikrotubula s lijeve i desne strane veća to je odklon od ishodišta veći, odnosno konačna pozicija kinetohora je sve dalja od ekvatorijalne ravnine diobenog vretena. Zanimljivo bi bilo model proširiti tako da se uzme u obzir mogućnost nukleacije mikrotubula na bilo kojoj točki u diobenom vretenu, a ne samo na polovima.

Istraživanje mehanizma poravnanja kromosoma na ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena u metafazi je od iznimne važnosti zbog njegove uloge u nastajanju aneuploidije. Potpuno shvaćanje ovog mehanizma bi omogućilo uvid u načine na koje može doći do nejednakog broja kromosoma u stanicama kćerima nakon mitoze i time jasniji uvid i u brojne zdravstvene poremećaje koji mogu proizaći iz toga.

## Literatura

- [1] Potapova T, Gorbsky GJ. The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology (Basel)*. 2017 Feb 8;6(1):12. doi: 10.3390/biology6010012. PMID: 28208750; PMCID: PMC5372005.
- [2] Rieder CL, Salmon ED. Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J Cell Biol* 1994; 124: 223–233.
- [3] Civelekoglu-Scholey G. Sharp D.J. Mogilner A. Scholey J.M. Model of chromosome motility in *Drosophila* embryos: adaptation of a general mechanism for rapid mitosis. *Biophys. J.* 2006; 90: 3966-3982 <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.078691>
- [4] Ke, K., J. Cheng, and A.J. Hunt. 2009. The Distribution of Polar Ejection Forces Determines the Amplitude of Chromosome Directional Instability. *Curr. Biol.* 19:807–815. doi:10.1016/j.cub.2009.04.036.
- [5] Patrik Risteski, Domagoj Božan, Mihaela Jagrić, Agneza Bosilj, Nenad Pavin, Iva M. Tolić, Length-dependent poleward flux of sister kinetochore fibers promotes chromosome alignment, *Cell Reports*, Volume 40, Issue 5, 2022, 111169, ISSN 2211-1247, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111169>.  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124722009822>)
- [6] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. An Overview of the Cell Cycle. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>
- [7] Pavin N, Tolić IM. Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle. *Annu Rev Biophys.* 2016 Jul 5;45:279-98. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010934. Epub 2016 May 4. PMID: 27145873.
- [8] C.L. Fonseca, H.L.H. Malaby, L.A. Sepaniac, W. Martin, C. Byers, A. Czechanski, D. Messinger, M. Tang, R. Ohi, L.G. Reinholdt, J. Stumpff. Mitotic chromosome alignment ensures mitotic fidelity by promoting interchromosomal compaction during anaphase. *J. Cell Biol.*, 218 (2019), pp. 1148-1163, 10.1083/jcb.201807228

- [9] Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Microtubules. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9932/>
- [10] Sharp, D. J., Rogers, G. C. & Scoley, J. M. Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407, 41-47 (2000)
- [11] Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jan;9(1):33-46. doi: 10.1038/nrm2310. PMID: 18097444.
- [12] McDonald KL, O'Toole ET, Mastronarde DN, McIntosh JR (1992) Kinetochore microtubules in PTK cells. *J Cell Biol* 118(2):369–383
- [13] McEwen BF, Chan GK, Zubrowski B, Savoian MS, Sauer MT, Yen TJ (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(9):2776–2789
- [14] Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Apr;9(4):309-22. doi: 10.1038/nrm2369. Epub 2008 Mar 5. PMID: 18322465.
- [15] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. An Overview of the Cell Cycle. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>
- [16] Kajtez, J., Solomatina, A., Novak, M. et al. Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores. *Nat Commun* 7, 10298 (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms10298>
- [17] Valentine, M., Fordyce, P., Krzysiak, T. *et al.* Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads *in vitro*. *Nat Cell Biol* 8, 470–476 (2006). <https://doi.org/10.1038/ncb1394>
- [18] Polak B. Risteski P. Lesjak S. Tolic I.M. PRC1-labeled microtubule bundles and kinetochore pairs show one-to-one association in metaphase. *EMBO Rep.* 2017; 18: 217-230

- [19] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) Molecular biology of the cell, 6th edn. Garland Science, New York
- [20] Petry S. Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly. *Annu Rev Biochem.* 2016 Jun 2;85:659-83. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014528. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27145846; PMCID: PMC5016079.
- [21] Sharp, Don & Rogers, Gregory & Scholey, Jonathan. (2000). Roles of motor proteins in building microtubule-based structures: A basic principle of cellular design. *Biochimica et biophysica acta.* 1496. 128-41. 10.1016/S0167-4889(00)00014-8.
- [22] Howard, J. Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. (2001).
- [23] Akiyoshi B, Sarangapani KK, Powers AF, Nelson CR, Reichow SL, Arellano-Santoyo H, Gonen T, Ranish JA, Asbury CL, Biggins S. Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature.* 2010 Nov 25;468(7323):576-9. doi: 10.1038/nature09594. PMID: 21107429; PMCID: PMC3108429.
- [24] Joglekar AP, Hunt AJ. A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements. *Biophys J.* 2002 Jul;83(1):42-58. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75148-5. PMID: 12080099; PMCID: PMC1302126.
- [25] Hamant, O., Inoue, D., Bouchez, D. *et al.* Are microtubules tension sensors?. *Nat Commun* **10**, 2360 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10207-y>
- [26] Wade, R., Kozielski, F. Structural links to kinesin directionality and movement. *Nat Struct Mol Biol* **7**, 456–460 (2000). <https://doi.org/10.1038/75850>
- [27] Scholz, T. , Vicary, J. A. , Jeppesen, G. M. , Ulcinas, A. , Hörber, J. K. H. , and Antognozzi, M. , 2011, “ Processive Behaviour of Kinesin Observed Using Micro-Fabricated Cantilevers,” *Nanotechnology*, 22(9), pp. 1–7. 10.1088/0957-4484/22/9/095707
- [28] Van Den Heuvel, M. G. L. , and Dekker, C. , 2007, “ Motor Proteins at Work for Nanotechnology,” *Science*, 317(5836), pp. 333–336. 10.1126/science.1139570