

# Samoorganizacija mikrotubula i motornih proteina u formiranju antiparalelnih svežnjeva diobenog vretena

---

**Ban, Ivana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*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:217:745926>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-08**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilište u Zagrebu

Ivana Ban

**SAMOORGANIZACIJA MIKROTUBULA I  
MOTORNIH PROTEINA U FORMIRANJU  
ANTIPARALELNIH SVEŽNJEVA  
DIOBENOG VRETENA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilište u Zagrebu

Ivana Ban

**SAMOORGANIZACIJA MIKROTUBULA I  
MOTORNIH PROTEINA U FORMIRANJU  
ANTIPARALELNIH SVEŽNJEVA  
DIOBENOG VRETENA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2023



University of Zagreb

Faculty of Science  
University of Zagreb

Ivana Ban

**SELF-ORGANIZATION OF  
MICROTUBULES AND MOTOR PROTEINS  
IN THE FORMATION OF ANTIPARALLEL  
BUNDLES OF MITOTIC SPINDLE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2023



## Informacije o mentoru

Nenad Pavin rođen je 05.05.1967. u Rijeci. Osnovnoškolsko obrazovanje započinje 1974. g. u Rijeci, a završava ga 1982. u Zadru, gdje također 1986.g. završava i srednju školu. Potom upisuje studij fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu gdje 1993.g. stječe zvanje diplomirani inženjer fizike te potom upisuje poslijediplomski studij gdje 1998.g. stječe zvanje magistar fizike. Doktorsku disertaciju izrađuje pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Vladimira Paara na istom fakultetu, naslova „Kaotični tranzijenti u novoj populacijskoj jednadžbi s rupom i njihov odraz na fraktalnu strukturu Arnoldovih jezika“, te ju brani 1999.g. Profesionalnu karijeru započinje na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, gdje od 1993.-2001.g. radi kao znanstveni novak na problemima iz teorije kaosa te se od 2001.g. na istom odsjeku zapošljava kao docent. Na znanstveno usavršavanje na Max Planck Institutu za fiziku kompleksnih sustava u Dresdenu odlazi 2007.g. gdje 4 godine boravi kao gost-znanstvenik kod prof. dr. sc. Franka Jülichera. Za vrijeme tog boravka svoj znanstveni interes proširuje na proučavanje fizikalnih procesa važnih u razumijevanju stanične biologije.

Ukupno je objavio 54 znanstvena rada od toga 49 u časopisima koji su zastupljeni u Current contents (CC). Među njima se ističu radovi objavljeni u časopisima velikom faktora utjecaja: Cell – 2 rada (IF 33.116), Nature Cell Biology (IF 20.058) – 1 rad, Nature Communications – 3 rada (IF 12.124), Current Biology – 1 rad (IF 10.834), Annual Review of Biophysics – 1 rad (IF 10.676), Developmental Cell – 2 rada (IF 9.174), Cell Reports – 1 rad (IF 9.995), Physical Review Letters – 2 rada (IF 7.645). Pod njegovim stručnim vodstvom izrađeno je 6 doktorskih disertacija te 10 diplomskih radova. Održao je više od 25 predavanja na međunarodnim znanstvenim skupovima i znanstvenim institutima. Kao voditelj ili suradnik, sudjelovao je u izvođenju niza projekata uključujući projekte koji se trenutno izvode: ERC Synergy „Molecular origins of aneuploidies in healthy and diseased human tissues (Aneuploidy)“ (iznos: 10,000,000 EUR), projekt Hrvatske zaklade za znanost (iznos: 1,000,000 HRK), projekt Znanstveni centar izvrsnosti za kvantne i kompleksne sustave te reprezentacije Liejevih algebri (iznos: 36.956.624,09 HRK).

Dobitnik je Državne nagrade za znanost za 2015. godinu. U 2022. godini dodijeljena mu je nagrada za postignute rezultate u znanstvenim ili znanstveno-nastavnim zvanjima Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Također, dodijeljena je Nagrada Europskog društva za mikroskopiju za izvanredan članak u kategoriji znanosti o životu: “The mitotic spindle is chiral due to torques within microtubule bundles”, M. Novak, B. Polak, J.

Simunić, Z. Boban, B. Kuzmić, A. Thomae, I.M. Tolić, N. Pavin, Nat Commun 2018, na kojem je Nenad Pavin glavni seniorni istraživač.

U nastavi je sudjelovao održavanjem predavanja za 7 predmeta na dodiplomskom studiju te 2 predmeta na poslijediplomskom studiju te vježbi na nizu predmeta. Također je sudjelovao u pripremi i operacionalizaciji novog studijskog smjera "Profesor fizike i informatike" (pokrenutog 2000.), a čiji je voditelj bio od 2000.-2005.g.

## **Zahvale**

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Nenadu Pavinu što me predano vodio kroz doktorski studij i prenio na mene svoj znanstveni entuzijazam, što sam imala priliku učiti od njega i razviti potrebne vještine za znanstveni rad. Zahvaljujem se što mi je bio mentor, prijatelj i znanstveni uzor. Zahvaljujem se prof. Ivi Tolić što se uvijek bila tu za konstruktivne rasprave i nove ideje kako približiti teoriju i eksperiment. Zahvaljujem se Marcelu Prelogoviću od kojeg sam puno naučila o stohastičkim procesima i Luciji Tomašić za sve diskusije tijekom razvijanja modela za evoluciju kariotipa. Puno se zahvaljujem i svim drugim kolegama iz Pavin i Tolić grupe koji su mi uljepšali vrijeme provedeno na fakultetu. Posebne zahvale idu mojim roditeljima koji su mi bili bezuvjetna podrška i Domagoju koji mi je uvijek dao vjetar u leđa kad je trebalo.

## Sažetak

Dioba stanica složen je proces koji počinje formiranjem diobenog vretena koje razdvaja kromosome u dvije stanice kćeri na kraju mitoze. Diobeno vreteno je mikrostroj, sazdan od mikrotubula, koji pažljivo organizira sile koje generiraju motorni proteini, a njegova se funkcionalnost oslanja na preciznosti samoorganizacije vretena. Pogreške u samoorganizaciji vretena mogu dovesti do krive podjele kromosoma (missegregacije) koja rezultira nepravilnim brojem kromosoma u stanicama kćeri. Stanje s nepravilnim brojem kromosoma naziva se aneuploidija. Aneuploidija u kombinaciji s velikom učestalošću dobitka i gubitka kromosoma može stvoriti domino efekt koji dovodi do razvoja tumorskih tkiva. U ovoj doktorskoj tezi želimo razumjeti ključne procese koji stoje iza formiranja antiparalelnih svežnjeva diobenog vretena, kao i istražiti koje su posljedice grešaka tijekom stanične diobe nakon više generacija. Kako bismo razumjeli evoluciju tumora iz zdravih stanica, razvili smo "makrokariotip model" i pokazali da perturbiran broj kromosoma u tumorskim stanicama uglavnom proizlazi zbog brže diobe stanica koje karakterizira specifična kombinacija kromosoma ili zbog kombinacije brže diobe i nepravilne stanične smrti tih stanica. Ovaj teorijski rezultat objašnjava eksperimentalno opažene kombinacije kromosoma u različitim stadijima razvoja tumora, uključujući mali broj aneuploidnih stanica u predtumorskim stadijima, kao i visoko aneuploidne stanice u tumorskom stadiju. Također istražujemo samoorganizaciju mikrotubula u antiparalelne svežnjeve i u tu svrhu razvijamo matematički model koji uključuje dinamiku mikrotubula i motornih proteina. Rješavanjem modela pokazujemo da mikrotubuli sa svakog pola traže one sa suprotnog pola izvodeći nasumično kutno kretanje. Nakon kontakta, dva mikrotubula usmjereno klize bočno jedan duž drugoga prema antiparalelnoj konfiguraciji. Uvodimo duljinu konture mikrotubula kao mjeru aktivnosti motora koji pokreću usmjerenu rotaciju mikrotubula, što otkriva da usmjerenje motora prema minus kraju dovodi mikrotubule u antiparalelnu organizaciju. Zaključno, naš teorijski pristup pridonosi boljem razumijevanju složenog procesa stanične diobe i dugoročnih posljedica njezina neispravnog funkcioniranja te na taj način povezuje dvije različite vremenske skale relevantne za pravilno funkcioniranje stanice.

Ključne riječi: dioba stanica, formiranje diobenog vretena, antiparalelni svežnjevi, sile, missegregacija kromosoma, evolucija kariotipa, aneuploidija, makrokariotip, teorijski model

## Abstract

Cell division is a complex process that starts with the formation of a mitotic spindle which segregates chromosomes into two daughter cells at the end of mitosis. The mitotic spindle is a microtubule based micro-machine that carefully orchestrates the forces generated by motor proteins and its functionality relies on the accuracy of spindle self-organization. Errors in spindle self-organization can lead to missegregation which produces aneuploidy, a state with irregular number of chromosomes. Aneuploidy in combination with propensity of gaining and losing chromosome with high frequency can create a domino effect which leads to the development of tumor tissues. In this thesis we aim to understand the key processes behind the formation of an antiparallel bundle of a mitotic spindle as well as explore what are the consequences of errors during cell division after multiple generations. To understand tumor evolution from healthy cells we develop a “macro-karyotype model” and show that the perturbed number of chromosomes in tumor cells arises predominantly from a faster division of cells characterized by a specific combination of chromosomes, or together with irregular cell death. This theoretical result explains experimentally observed combination of chromosomes in different stages of tumor development including a small number of aneuploid cells in pretumor stages as well as highly aneuploid cells in tumor stage. We also investigate the self-organization of microtubules into an antiparallel bundle and for that purpose develop a mathematical model that includes the dynamics of microtubules and motor proteins. By solving the model, we show that microtubules from each pole search for those from the opposite pole by performing a random angular movement. Upon contact, two microtubules slide sideways along each other in a directed manner toward the antiparallel configuration. We introduce the contour length of microtubules as a measure of the activity of motors that drives microtubule sliding, which reveals that minus-end-directed motility drives microtubules into an antiparallel organization. In conclusion, our theoretical approach contributes to a better understanding of the complex process of cell division and the long-term consequences of its malfunctioning and thereby connects two different timescales relevant for proper cell functioning.

Keywords: cell division, spindle assembly, antiparallel microtubule bundles, forces, chromosome missegregation, karyotype evolution, aneuploidy, macro-karyotype, theoretical model

## Extended abstract

### *Introduction*

Cell division is a fundamental process during which new cells arise from the division of existing ones providing the foundation for life continuity and inheritance. During cell division, the genetic material is divided into two equal parts by the mitotic spindle, a complex dynamic micro-machine made of microtubules, chromosomes and a variety cross-linking proteins. The genetic material is observed under the microscope in the form of a chromosome that resembles 'X'-shaped structure. Cells can be classified based on ploidy, the number of complete sets of chromosomes they contain: haploid (one set), diploids (two sets), triploids (three sets), etc. The term karyotype refers to the number and external appearance of chromosomes in a cell. Karyotype can also refer to a laboratory-produced image of chromosomes isolated from an individual cell and arranged in numerical order. A cell is considered vital if it efficiently produces new cells of the same karyotype.

Euploid karyotype is a result of natural selection for the best vitality of a species in its ecological niche. Errors during cell division often result in daughter cells having a karyotype with an abnormal number of chromosomes, condition called aneuploidy. Approximately 90% of tumors are aneuploid, and they also have a higher frequency of missegregation, known as chromosomal instability. This instability contributes to the diverse karyotypes among tumor cells. The impact of aneuploidy on human health has sparked great interest in understanding the mechanisms behind it. Studying self-organization of the mitotic spindle is crucial to understanding how errors during cell division arise and evolve in time.

Forming a bipolar spindle is essential for accurate chromosome division. The core of the mitotic spindle is comprised of microtubules extending from opposite poles and interact with each other, giving rise to antiparallel bundles of microtubules known as interpolar microtubules. These bundles interact laterally with kinetochore microtubules and regulate the forces acting on chromosomes and spindle poles. Thus, microtubule bundle formation is the key processes of mitotic spindle self-organization and therefore understanding antiparallel bundle formation will contribute to understanding the formation of mitotic spindle itself.

In this work we develop a “macro-karyotype model” in order to understand long-term consequences of mitotic errors, and show that the perturbed number of chromosomes in tumor cells arises predominantly from a faster division of cells characterized by a specific combination of chromosomes. We also investigate the self-organization of microtubules into an antiparallel

bundle and for that purpose develop a mathematical model that includes the dynamics of microtubules and motor proteins. Our model solutions reveal that minus-end motor proteins slide microtubules sideways along each other toward the antiparallel configuration. These results contribute to better understanding how cell orchestrates such a complex process of cell division.

### *Theoretical model for karyotype evolution*

Theoretical exploration of tumor karyotype evolution poses two main challenges: tumor tissues consist of a large number of karyotype combinations and a large number of cells. To tackle these problems, we design a novel mathematical approach based on a concept of a macro-karyotype in which we follow numerical chromosome aberrations. Macro-karyotype represents a macrostate that encompasses many different karyotypes that correspond to microstates. We define a macro-karyotype as a karyotype that contains the copy number of specific chromosomes that are crucial for the process of interest, whereas for other chromosomes only the total chromosome gains and losses are counted. Macro-karyotypes contain all relevant information about the exact cell karyotype, while substantially reducing the number of karyotype combinations and allowing for the use of mean-field calculations, which can describe large populations. Thus, the strength of this approach lies in that it allows us to follow karyotype evolution for a virtually unlimited number of cells and generations.

### *Comparison with experiments*

In a recent mouse model with high levels of chromosome missegregation, experiments have shown that chromosome gains dominate over losses both in pretumor and tumor tissues, whereas tumors are characterized by gains of chromosomes 14 and 15. In order to explore the mechanisms driving clonal selection, we introduce a mathematical model by which we predict karyotype evolution.

By studying evolution of aneuploid karyotypes over multiple generations, we found that tumor karyotypes arise from proliferation-driven evolution of aneuploid cells. We compare our theory with experimentally observed karyotypes in different stages of development of thymic lymphomas in a recent mouse model. For early stages, the mathematical model predicts that increased apoptosis and slower proliferation of cells with monosomies lead to predominant chromosome gains over losses. In developed tumor cells, the observed gain of chromosome 15 requires karyotype-dependent proliferation, whereas in the case of gain of chromosomes 14 and

15 an interplay between karyotype-dependent proliferation and apoptosis is an additional possible pathway. Thus, our mathematical model explains all stages of tumor development and it predicts that the evolution of tumor-specific karyotypes is primarily driven by proliferative advantage of specific aneuploid karyotypes.

### *Theoretical model for antiparallel bundle formation*

To explore how the microtubules, which extend in arbitrary directions, become aligned into an antiparallel bundle connecting the spindle poles, we introduce a simple physical model (Fig. 4a and Methods). The central idea of our theoretical approach is that microtubules perform rotational movement around the spindle pole, allowing them to explore the space as they search for the microtubules extending from the opposite pole and to establish a configuration required for spindle assembly. In our model, two types of forces drive the rotational movement of microtubules: forces generated by motor proteins and thermal forces. The forces generated by motors appear when microtubules get into close proximity allowing the motors to attach in this region and thus crosslink the microtubules. A motor is described as an elastic spring, whose two ends can move along two microtubules. The motors move towards the microtubule minus end, which is at the spindle pole, generating a directed force on the microtubules that rotates them towards the pole-pole axis. A motor is considered as a force generator, whose velocity decreases under load. In contrast to motor-generated forces, thermal forces are random and always present irrespective of the distance between the microtubules. To keep the model simple, we consider straight microtubules of a constant length extending from each spindle pole. microtubules are pinned at one end at the nuclear envelope of a spherical shape. We use this model to calculate the dynamics of antiparallel bundle formation.

### *Comparison with experiments*

Solutions of the model show that microtubules initially perform random angular movement which is predominantly driven by thermal forces. This random movement ends when the microtubules come close enough to each other so that motors can attach. Subsequently, polar angles change in a directed manner and form a stable antiparallel bundle. These results correspond to experimental observations that characterize the search and alignment step of bundle formation.

To help us interpret decreasing contour length observed in experiments, we used the model to explore the change in microtubule contour length. Here we start our calculations from



the configuration in which the microtubules are in contact. We find that the contour length difference decreases towards zero and remains constant afterwards. The contour length decreases linearly at a velocity close to twofold the velocity of motors along each microtubule. Interestingly, we showed that the contour velocity does not depend on the distance between poles nor on the initial microtubule configuration which implies that this velocity is robust to changes in the geometry of the system. We also find that with passive crosslinkers, the contour length is almost constant over time and microtubules alignment does not occur on relevant time scales, even though crosslinkers remain attached to the microtubules. Taken together, our results suggest that the minus end directed motors align the microtubules into an antiparallel bundle and allow us to identify their velocity.

### *Conclusion*

Theoretical models developed in this work contribute to a better understanding of the complex process of mitotic spindle self-organization as well as understand the long-term consequences of its malfunctioning and thereby connects two different timescales relevant for proper cell functioning.

# Sadržaj

<b>1</b>	<b>Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1	Biološka motivacija .....	1
1.2	Stanice s nepravilnim brojem kromosoma i njihova evolucija.....	2
1.2.1	Aneuploidija i pripadne bolesti .....	2
1.2.2	Evolucija kariotipa u višestaničnim organizmima.....	4
1.2.3	Teorijski modeli za evoluciju kariotipa .....	5
1.3	Građa i formiranje diobenog vretena .....	6
1.3.1	Diobeno vreteno, mikrotubuli i motorni proteini .....	6
1.3.2	Samorganizacija diobenog vretena .....	13
1.3.3	Modeli formiranja diobenog vretena .....	15
<b>2</b>	<b>Matematički alati za sustave sa šumom .....</b>	<b>17</b>
2.1	Stohastički procesi .....	17
2.1.1	Nasumične varijable .....	17
2.1.2	Markovljevo svojstvo .....	19
2.1.3	Stacionarni procesi .....	20
2.1.4	Master jednažba .....	21
2.2	Stohastičke diferencijalne jednažbe .....	22
2.2.1	Wienerov proces .....	23
2.2.2	Ito lema .....	25
2.2.3	Bijeli šum .....	26
2.2.4	Langevinova jednažba .....	27
2.2.5	Fokker-Planckova jednažba .....	30
2.2.6	Ito i Stratonovich dilema .....	31
2.3	Kinetička jednažba .....	33
<b>3</b>	<b>Teorijski opis evolucije kariotipa .....</b>	<b>36</b>
3.1	„Makrokariotip“ model .....	36
3.1.1	Definicija kariotipa i stablo podrijetla .....	36
3.1.2	Vremenska evolucija za populaciju stanica .....	38
3.1.3	Jednažba stope za broj stanica s određenim kariotipom .....	39
3.1.4	Definicija makrokariotipa i redukcija dimenzionalnosti .....	40
3.2	Rješenja modela .....	44
3.2.1	Stanice s maksimalno 2 kopije kromosoma .....	44
3.2.2	Stanice s maksimalno 3 kopije kromosoma .....	56
<b>4</b>	<b>Evolucija tumorskih kariotipa miša i njihova teorijska interpretacija .....</b>	<b>66</b>
4.1	Rješenja modela za predtumorske stanice miša .....	67
4.2	Rješenja modela za T-stanični limfom s jednim specifičnim kromosomom .....	72
4.3	Rješenja modela za T-stanični limfom s dva specifična kromosoma .....	76
<b>5</b>	<b>Formiranje diobenog vretena kvasca .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Teorijski opis formiranja diobenog vretena.....</b>	<b>85</b>
6.1	Model za formiranje antiparalelnih svežnjeva .....	85
6.1.1	Orijentacija mikrotubula .....	86
6.1.2	Sile, momenti sila i brzina vezivnih proteina .....	87
6.1.3	Modeliranje vezanja i odvezivanja vezivnih proteina .....	88

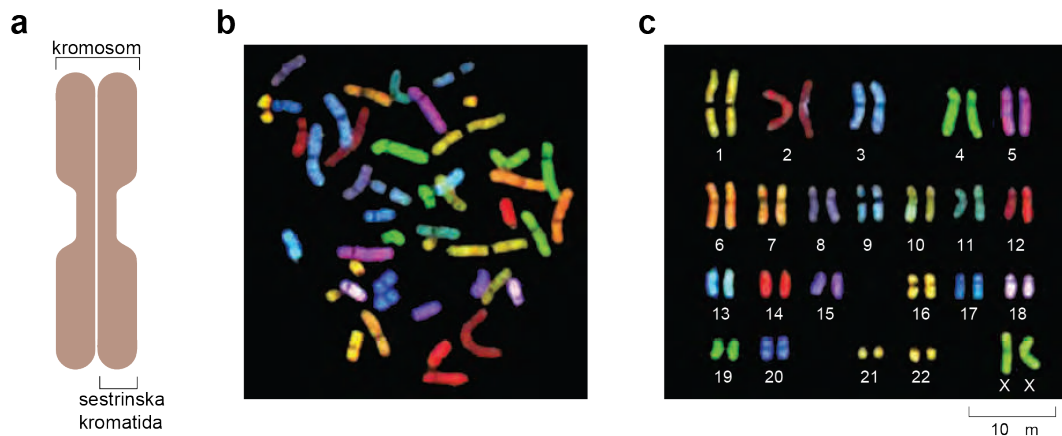
6.1.4	Rješenja modela .....	88
<b>6.2</b>	<b>Predikcije modela i usporedba s eksperimentima.....</b>	<b>91</b>
6.2.1	Odabir parametara.....	97
<b>7</b>	<b>Zaključak.....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Dodatak .....</b>	<b>101</b>
8.1	Izračun stopa missegregacije i apoptoze.....	101
8.2	Aproksimativni izraz za kromosomske dobitke .....	101
<b>9</b>	<b>Popis literature.....</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Životopis i popis radova .....</b>	<b>108</b>

# 1 Uvod

## 1.1 Biološka motivacija

Stanična dioba je fundamentalan proces tijekom kojeg iz postojećih stanica nastaju nove stanice. Ovaj proces temelj je kontinuiteta života i nasljedstva (Wilson, 1925). Na početku stanične diobe, formira se molekularni stroj, diobeno vreteno, sagrađen od mikrotubula i molekularnih proteina (Mcintosh et al., 2012; Pavin & Tolic, 2016; Wittmann et al., 2001). Glavna zadaća diobenog vretena, koji se formira tokom mitoze, je pravilno podijeliti duplicirani genetski materijal između novonastalih stanica kćeri (Prosser & Pelletier, 2017). Za vrijeme mitoze, genetski materijal opaža se pod mikroskopom u obliku kromosoma koji izgledom podsjeća na oblik slova 'X', a jedan krak kromosoma zove se sestrinska kromatida (**slika 1.1a, b**) (Tamarin, 1998). Dioba ulazi u završnu fazu podjelom sestrinskih kromatida između dvije stanice kćeri, koje pokreće diobeno vreteno, te konačno odvajanjem stanica kćeri.

Svaka stanica ima karakterističan set kromosoma koji naslijedi, a broj kompletnih setova kromosoma koje stanica ima zovemo ploidija. Tako se stanice mogu opisati prema broju kompletnih setova koje sadrže: haploidne stanice imaju jedan set kromosoma, diploide dva seta kromosoma, triploidne tri seta kromosoma itd. Par istih kromosoma u diploidnim stanicama čine homologni par stoga ih nazivamo homologni kromosomi (Tamarin, 1998). Ljudske stanice su diploidne jer sadrže 23 para homolognih kromosoma, što daje ukupno 46 kromosoma koliko normalno ima zdrava ljudska stanica. Na broj i vanjski izgled kromosoma u stanici referiramo se izrazom kariotip. Kariotip se također može odnositi na laboratorijski proizvedenu sliku kromosoma izoliranih iz pojedinačne stanice i poredanih brojčanim redoslijedom. Na **slici 1.1c** je ilustriran tipičan ljudski kariotip koji ima 23 para kromosoma.



**Slika 1.1:** Genetski materijal ljudske stanice. **a**, prikaz metafaznog kromosoma koji se sastoji od dvije sestrinske kromatide. **b**, kromosomi ženske osobe izolirani iz stanice tijekom mitoze. Svaki kromosom je „obojan“ drugom bojom kako bi se omogućila njegova identifikacija pod fluorescentnim mikroskopom. **c**, isti kromosomi poredani svojim numeričkim redoslijedom. Ovakav raspored potpunog kromosomskog seta naziva se kariotip. Preuzeto i modificirano iz (Alberts et al., 2015).

Budući da je propagacija ispravnog kariotipa glavna zadaća diobenog vretena, stanica je razvila niz zaštitnih mehanizama kako bi osigurala visoku preciznost procesa diobe. Dva najvažnija nadzorna mehanizma su: (i) Korekcija krivih spojeva, ovaj mehanizam ispravlja kromosome koji nisu ispravno spojeni na mikrotubule. Kako bi se kromosomi ispravno podijelili moraju se pravilno povezati s mikrotubulima koji se protežu iz dva pola diobenog vretena. Zbog stohastičke prirode ovog procesa kromosomi se rijetko istovremeno pričvršćuju na mikrotubule što rezultira time da je pričvršćivanje kinetohora i mikrotubula proces sklon greškama koje je potrebno ispraviti prije segregacije kromosoma; (ii) Kontrolna točna diobe, ovo je višeproteinska signala mreža koja blokira razdvajanje kromosoma sve dok se svi kromosomi ispravno povežu s mikrotubulima i poravnaju u metafaznoj ravnini (Sacristan & Kops, 2015). Ukoliko neki od ovih sigurnosnih signalnih mreža oslabi ili ne funkcionira ispravno mogu se desiti greške tijekom diobe koje ostavljaju trag u kariotipima stanica kćeri.

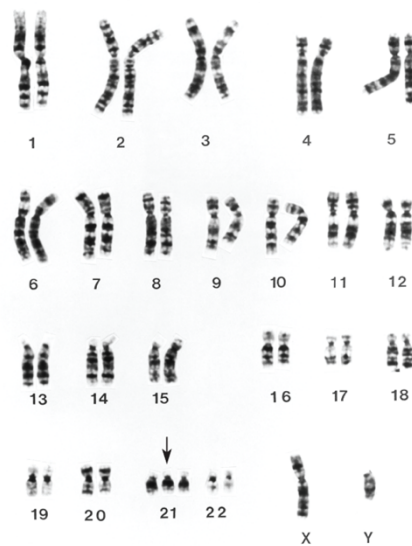
## 1.2 Stanice s nepravilnim brojem kromosoma i njihova evolucija

### 1.2.1 Aneuploidija i pripadne bolesti

Greške tijekom stanične diobe, odnosno missegregacija kromosoma, najčešće rezultiraju time da stanice kćeri imaju kariotip s viškom ili manjkom kromosoma u odnosu na stanicu majku. Stanje kada stanica ima kariotip s abnormalnim brojem kromosoma zovemo aneuploidija (Holland & Cleveland, 2009; Ricke & van Deursen, 2013; Weaver & Cleveland, 2006). Gotovo sve aneuploidije koje nastaju tijekom ranog embrionalnog razvoja su

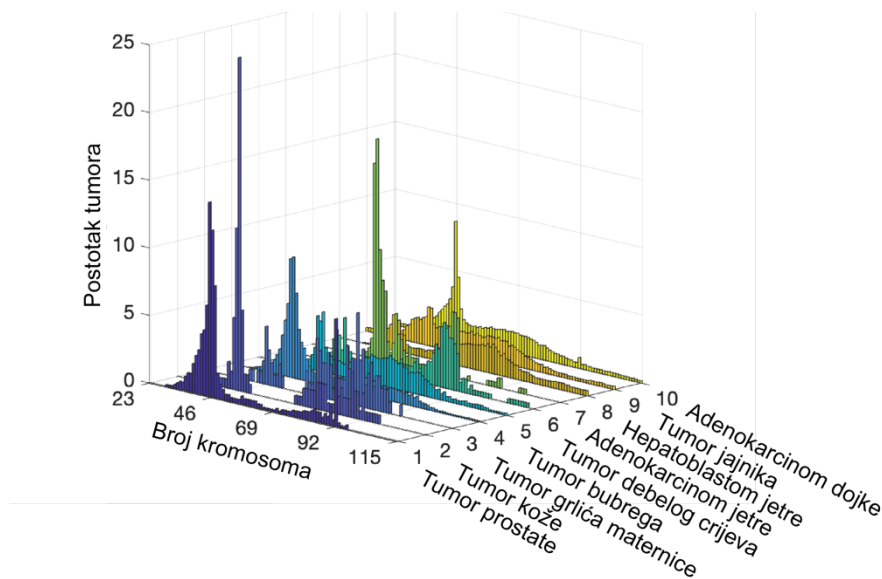
smrtonosne, uz rijetke iznimke kao što je primjerice trisomija kromosoma 21 kod ljudi koja je karakteristična za Downov sindrom i na koju ukazuje strelica na **slici 1.2** (Potapova & Gorbsky, 2017).

Kod ljudi, diploidni kariotip rezultat je prirodne selekcije zbog najbolje vitalnosti tih stanica. Vitalnost stanice definirana je kao njena sposobnost da se dijeli u danom okruženju. Aneuploidija mijenja fiziologiju stanice na mnogo načina, ovisno o tome koji su kromosomi višak ili nedostaju. Promjene u broju kopija kromosoma mijenjaju proizvodnju proteina. Neravnoteže u razinama proteina remete rad stanice što kao rezultat ima velik utjecaj na vitalnost stanice. Stanice koje imaju smanjenu vitalnost često rastu sporije od svojih euploidnih pandana (Ben-David & Amon, 2019; Potapova & Gorbsky, 2017).



**Slika 1.2:** Kariotip osobe s Downovim sindromom. Strelica ukazuje na trisomiju kromosoma 21. Izvor: L. Willatt, East Anglian Regional Genetics Service/science Photo Library.

Otprilike 90% tumora imaju stanice s viškom ili manjkom kromosoma. Broj kromosoma u tumorskim stanicama jako je varijabilan te može sezati čak do 200, iako većina tumorskih stanica ima od 40 do 60 kromosoma, **slika 1.3** (Storchova & Kuffer, 2008). Osim aneuploidije, tumorske stanice karakterizira povećana frekvencija missegregacije, efekt koji zovemo kromosomska nestabilnost. Kromosomska nestabilnost pridonosi velikoj heterogenosti u kariotipu među tumorskim stanicama (Duijf & Benezra, 2013; Ganem et al., 2009; Garribba & Santaguida, 2022; Holland & Cleveland, 2009; Lengauer et al., 1997; Thompson et al., 2010; van Jaarsveld & Kops, 2016).



**Slika 1.3:** Distribucija broja kromosoma za 10 tipova tumora. Izvor je Mitelman baza podataka (<https://mitelmandatabase.isb-cgc.org/>).

## 1.2.2 Evolucija kariotipa u višestaničnim organizmima

Dioba stanica je kontinuirani proces u kojem broj stanica eksponencijalno raste u vremenu, a kod višestaničnih organizama događa se prilikom njihovog razvoja. U slučaju ispravnih dioba isti kariotip se prenosi na sljedeće generacije, dok je u slučaju tumorskih stanica evolucija kariotipa puno dinamičnija budući da se dešavaju greške tijekom diobe koje mijenjaju kariotip. Opisane promjene kariotipa u vremenu zovemo evolucija kariotipa. S obzirom na to da su tumorske stanice aneuploidne, jedno od najzanimljivijih znanstvenih pitanja je kako izgleda evolucija kojom zdrave stanice s diploidnim kariotipom postaju tumorske.

Budući da aneuploidija ima velik utjecaj na zdravlje ljudske populacije, postoji i velika želja za razumijevanjem mehanizama koji dovode do tog stanja. Najčešće korišteni modelni organizmi za istraživanje aneuploidije su miševi. Razlog tomu je što su miševi biološki vrlo slični ljudima i mogu se genetski manipulirati da oponašaju gotovo svaku ljudsku bolest ili

stanje. Također, miševi imaju ubrzani životni vijek, pri čemu je jedna mišja godina ekvivalentna 30 ljudskih godina. Stoga se njihov cjelokupni životni ciklus može proučiti unutar samo dvije ili tri godine. Proučavanje mišjih modela aneuploidije vrlo je važno za razumijevanje mehanizama koji dovode do aneuploidije kao i za testiranje novih terapija (Sheppard et al., 2012).

### **1.2.3 Teorijski modeli za evoluciju kariotipa**

Istraživanje evolucije kariotipa je eksperimentalno vrlo izazovno jer zahtjeva praćenje svih relevantnih kariotipa preko velikog broja generacija. Zbog velikog broja kombinacija koji ima primjerice kariotip ljudske stanice ovaj problem predstavlja izazov i za teorijsko modeliranje. Stoga, svega je nekoliko teorijskih modela koji su proučavali na koji način kromosomska nestabilnost utječe na kariotip, a njihov pregled dan je u ovom poglavlju.

Teorijski modeli za evoluciju kariotipa dizajnirani su tako da se fokusiraju na neki od ključnih aspekta ovog kompleksnog procesa. U jednoj od najranijih teorijskih studija razvijen je stohastički model koji opisuje evoluciju broja kopija kromosoma koja nastaje kao posljedica grešaka u diobi. Rezultati modela sugeriraju da dinamika rasta populacije ovisi o stopi missegregacije. Također je izračunata teorijska gornja granica za stopu missegregacije koja omogućuje preživljavanje diploidnih stanica a ovisi o broju kopija koji kromosom može imati i o početnoj stanici (Gusev et al., 2000, 2001). Novija teorijska studija koja proučava evoluciju kariotipa osim missegregacije uključuje i duplikaciju genetskog materijala stanice. Osim toga, svakom kromosomu pridružena je vrijednost ovisno o tome koje gene nose kojom se uzima u obzir različit utjecaj dobitaka ili gubitaka određenih kromosoma na vjerojatnost preživljavanja stanice. Rezultati teorijskog modela baziranom na markovljevim lancima pokazali su da heterogenost kariotipa primarno ovisi o stopi missegregacije, a ne o broju generacija (Elizalde et al., 2018). Korištenjem stohastičkih simulacija također je pokazano da populacija stanica, neovisno o početnim uvjetima konvergira u populaciju koja ima približno triploidan kariotip (Laughney et al., 2015). Stohastičkim simulacijama također su proučavani efekti missegregacije tijekom razvoja tumora u tkivima, gdje je tkivo predstavljeno linearnim nizom stanica, a svaka stanica ovisno o genomu može na drugačiji način regulirati podjelu stanica, apoptozu i missegregaciju (Araujo et al., 2013). U nedavno objavljenom radu razvijeno je kvantitativno sučelje za simulaciju i mjerenje kromosomske nestabilnosti koje je primjenjeno na kliničkim uzorcima tumora (Lynch et al., 2022).

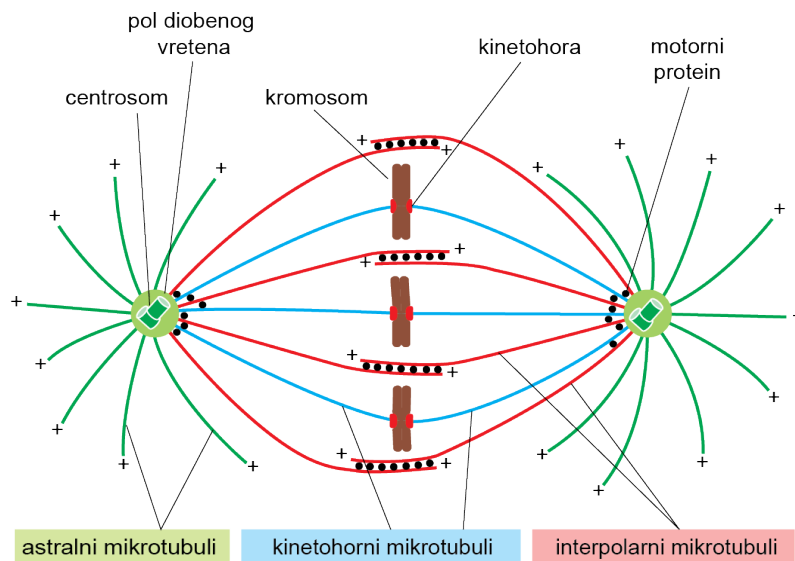


## 1.3 Građa i formiranje diobenog vretena

### 1.3.1 Diobeno vreteno, mikrotubuli i motorni proteini

Da bismo razumjeli kako dolazi do grešaka prilikom stanične diobe potrebno je proučiti biološke procese diobe, pri čemu je razumijevanje fizikalnih procesa koji dovode do nastanka diobenog vretena i njegovog pravilnog funkcioniranja od ključne važnosti. Kako bi razumjeli biološke i fizikalne procese diobe moramo se prvo upoznati s građom diobenog vretena.

Diobeno vreteno je izrazito dinamična struktura koja postiže svoj karakterističan ravnotežni oblik u metafazi, fazi koja neposredno prethodi fizičkom razdvajanju kromosoma (Tolić, 2018). Kostur diobenog vretena čini bipolarna mreža mikrotubula koji se protežu iz dva pola diobenog vretena koji su u ljudskim stanicama smješteni u organele koje zovemo centrosomi, **slika 1.4**. Mikrotubuli su dugi i skoro savršeno ravni proteinski filamenti koje možemo podijeliti u tri skupine: kinetohorne, interpolarne i astralne (Alberts et al., 2015). Astralni mikrotubuli protežu se iz polova diobenog vretena i interagiraju sa staničnom korom te su zbog toga bitni za pozicioniranje diobenog vretena unutar stanice. Kinetohorni mikrotubuli imaju ulogu povezivanja kromosoma s polovima diobenog vretena preko kinetohora, specijaliziranim proteinskim kompleksima koji se nalaze na kromosomima. Mikrotubuli koji se protežu iz suprotnih polova i interagiraju u sredini pomoću motornih proteina tvoreći antiparalelne svežnjeve spadaju u interpolarne mikrotubule. Motorni proteini su enzimske molekule koje pretvaraju kemijsku energiju u mehanički rad te tako koračaju duž linearnih staza, koje u ovom slučaju čine mikrotubuli, te imaju ključni ulogu u organizaciji, funkciji i dinamici diobenog vretena.



**Slika 1.4:** Građa diobenog vretena. „Plus“ krajevi mikrotubula (označeni sa „+“ u shemi) protežu se iz pola diobenog vretena, dok su „minus“ krajevi (nisu naznačeni u shemi) usidreni na polovima vretena koji su ovdje smješteni u centrosomima. Kinetohorni mikrotubuli (plave linije) povezuju polove vretena s kinetohorama na kromosomu (crveni oval na smeđem objektu). Interpolarni mikrotubuli (crvene linije) iz dvaju polova interagiraju putem motornih proteina (crni kružići) na sredini vretena. Astralni mikrotubuli (zelene linije) protežu se iz polova u citoplazmu. Preuzeto iz (Alberts et al., 2015).

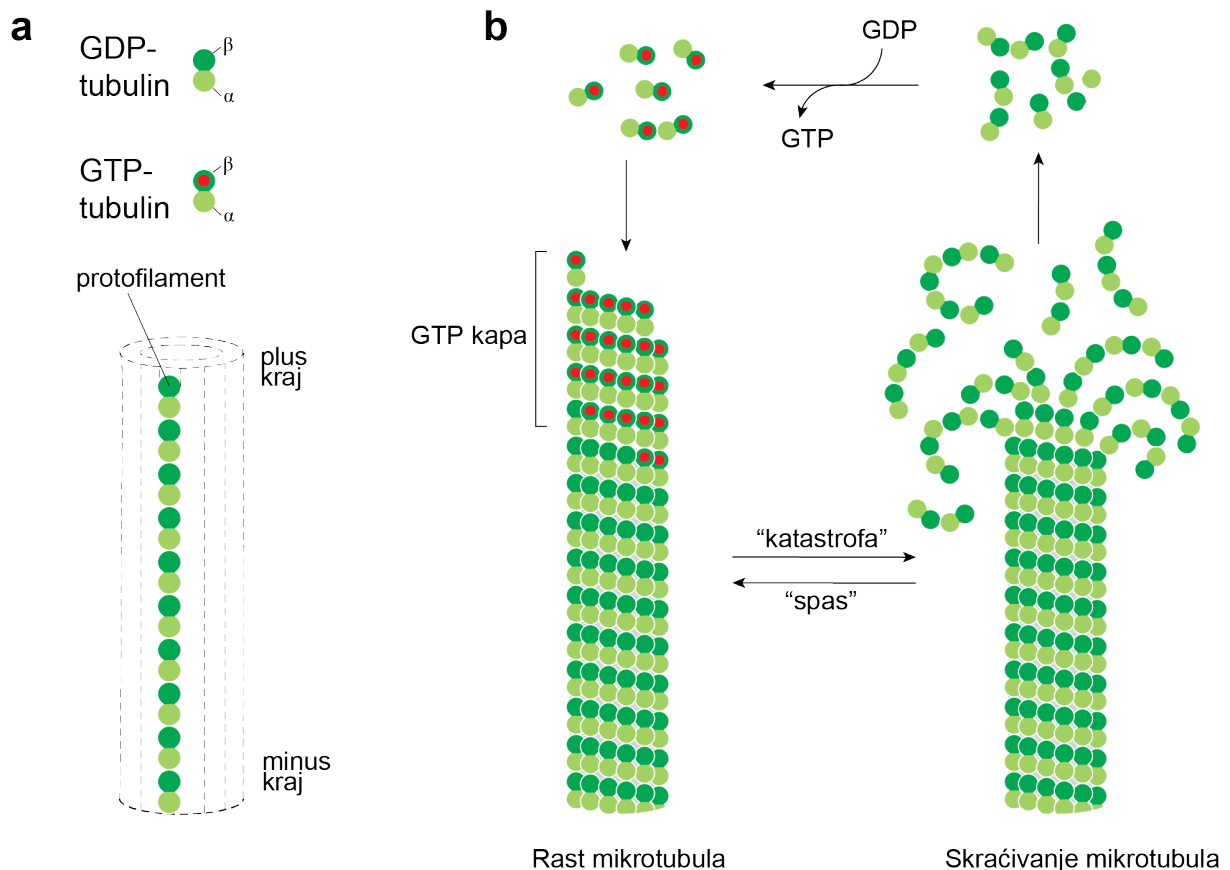
**Mikrotubuli.** Stanični citoskelet je struktura koja pomaže stanici održati oblik i unutarnju organizaciju. Osim toga, ta struktura također predstavlja mehaničku potporu koja omogućava stanici obavljanje esencijalnih funkcija kao što su stanična dioba. Građivni elementi citoskeletona čine tri velike skupine filamenata: aktini, mikrotubuli i intermedijalna vlakna. Svaka skupila filamenata je zaslužna za različite aspekte prostorne organizacije stanica te njenih mehaničkih svojstava. Osim što grade diobeno vreteno, mikrotubuli imaju bitnu ulogu u unutar staničnom transportu tako što služe kao tračnice za motorne proteine koji onda mogu transportirati organele.

Mikrotubuli su šuplje cilindrične strukture što ih čini krućim od drugih citoskeletnih filamenata i omogućuje im da se protežu duž cijele stanice, tvoreći nizove dugačke desetke mikrometara. Građene podjedinice mikrotubula čine proteini tubulina koji je heterodimer, odnosno sastoji se od globularnih proteina  $\alpha$ -tubulina i  $\beta$ -tubulina snažno vezanih nekovalentnim vezama. Tubulini su raspoređeni u linearne niti koje zovemo protofilamenti, **slika 1.5a**. Većina mikrotubula sadrži 13 paralelnih protofilamenata od kojih je svaki sastavljen od  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimera poredanih naizmjenično jedan za drugim u kolonu (Gudimchuk & Richard McIntosh, 2021). Ova organizacija čini mikrotubule polarnima, što znači da imaju usmjerenost cijelom svojom duljinom i da su im dva kraja različita. Polarnost je bitna za mnoge

funkcije mikrotubula, budući da omogućuje usmjerena kretanja motornih proteina na površini mikrotubula, osiguravajući staze za transport vezikula i organela pokretan motornim proteinom na velike udaljenosti. Na jednom kraju mikrotubula nalazi se  $\alpha$  tubulin i taj kraj zovemo „minus“ kraj, dok drugi kraj završava s  $\beta$  tubulinom i zovemo ga „plus“ kraj. Osim strukturne polarnosti, mikrotubuli također imaju dinamičku polarnost koja je karakterizirana time što „plus“ kraj mikrotubula raste i skraćuje se većom brzinom nego „minus“ kraj.

Rast i skraćivanje mikrotubula pokretano je vezanjem i hidrolizom nukleotida, u ovom slučaju molekula GTP-a (guanozin-trifosfat). Svaki  $\alpha$  ili  $\beta$  monomer ima vezno mjesto za jednu molekulu GTP-a. GTP koji je vezan na  $\alpha$ -tubulin fizički je zarobljen na sučelju dimera i nikada se ne hidrolizira. Upravo je iz tog razloga „minus“ kraj mikrotubula manje dinamičan. Nasuprot tome, kada se GTP veže na  $\beta$  tubulin može doći do hidrolize pri čemu se oslobađa fosfatna skupila a GDP ostaje vezan za  $\beta$  tubulin. Stoga, „plus“ kraj mikrotubula može biti u dva različita stanja, jednom kada je na njegov kraj vezana GTP molekula i drugom kada je na njegov kraj vezana GDP molekula. Energija hidrolize nukleotida sačuvana je u elastičnoj napetosti mikrotubula što čini promjenu slobodne energije za disocijaciju podjedinice na kojoj je vezan GDP negativnijom od one za disocijaciju podjedinice na kojoj je vezan GTP. Stoga, kada je „plus“ kraj mikrotubula u GTP konfiguraciji imat će tendenciju rasta ili polimerizacije, a ukoliko je u GDP konfiguraciji imat će tendenciju skraćivanja tj. depolimerizacije. Jesu li podjedinice tubulina na samom kraju mikrotubula u GTP ili GDP obliku ovisi o relativnim brzinama hidrolize GTP-a i dodavanja tubulina. Ako je stopa dodavanja podjedinice velika, i stoga filament brzo raste, tada je velika vjerojatnost da će nova podjedinica biti dodana polimeru prije nego što nukleotid u prethodno dodanoj podjedinici bude hidroliziran. U tom slučaju, vrh polimera ostaje u GTP obliku, tvoreći GTP kapu. Međutim, ako je brzina dodavanja podjedinice niska, može doći do hidrolize prije dodavanja sljedeće podjedinice, a vrh filameta tada će biti u GDP obliku. No, ukoliko je brzina dodavanja tubulina podjednaka brzini hidrolize GTP-a, tada može doći do naglih i nasumičnih izmjena faze rasta i skraćivanja što zovemo dinamička nestabilnost. Promjena dinamike iz rasta mikrotubula u skraćivanje zove se *katastrofa*, dok se ponovna promjena u rast zove *spas*. Rastući krajevi mikrotubula izgledom podsjećaju na listove protofilamenta koji mogu fluktuirati između blago savijenog i ravnog oblika, a njihovim zatvaranjem stvara se mikrotubul. Sačuvana elastična napetost od hidrolize GTPa uzrokuje konformacijsku promjenu koja može destabilizirati bočne kontakte između susjednih protofilamenata, stoga skraćujući mikrotubul karakteriziraju strukture poput fontane. Ciklus polimerizacije-depolimerizacije dovršen je razmjenom GDT u tubulinu koji se odvojio od mikrotubula sa GTP-om, **slika 1.5b** (Alberts et al., 2015).

U stanicama se više mikrotubula može organizirati u veće strukture, koja ovisi o tipu stanice ili funkciji koju trebaju obaviti. U diobenom vretenu, mikrotubuli se protežu iz dva pola diobenog vretena. Ukoliko rastu iz istog pola u istom smjeru formiraju strukture paralelnih mikrotubula, koje nazivamo paralelni svežnjevi. Mikrotubuli koji rastu iz različitih polova jedan prema drugom, te se stoga protežu u suprotnom smjeru, formiraju strukture koje nazivamo antiparalelni svežnjevi. Premda su mikrotubuli glavni elementi ovakvih struktura, za njihov su nastanak potrebni i dodatni građevni elementi koji su opisani u sljedećem odjeljku.



**Slika 1.5:** Građa i dinamika mikrotubula. **a**, Heterodimeri tubulina s  $\beta$ -tubulinom u GDP i GTP formi i shematski prikaz protofilamenta koji je načinjen od GDP tubulina. **b**, Na vrhu rastućeg mikrotubula nalazi se stabilna „kapa“ GTP podjedinica. Gubitak te „kape“ dovodi do destabilizacije lateralnih veza što uzrokuje konformacijsku promjenu protofilamenata u svoj zakrivljeni oblik što dovodi do skraćivanja mikrotubula. Raspadnute GDP podjedinice ponovo prelaze u GTP formu te je time upotpunjen ciklus rasta-skraćivanje mikrotubula. Preuzeto iz (Alberts et al., 2015).

**Motorni proteini.** Biološke stanice su složeni heterogeni sustavi koji prolaze kroz mnoge dinamičke biokemijske procese, kao što su replikacija gena, transkripcija i translacija, transport vezikula i organela između različitih lokacija i segregacija kromosoma tijekom mitoze. Sposobnost stanice da obavlja te procese na brz i učinkovit način uvelike se oslanja na

motorne i pasivne molekularne proteine, za koje općenito možemo koristiti izraz vezivni proteini.

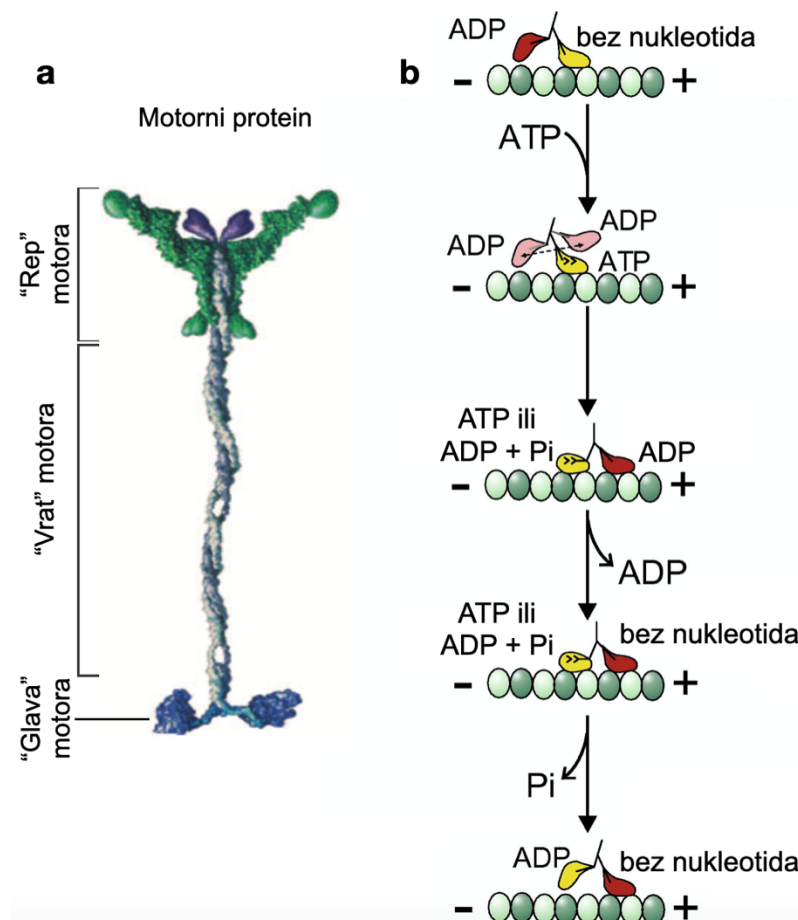
U stanicama postoji velik broj motornih proteina koji se razlikuju po: tipu filamenata za koje se vežu (aktinska vlakna ili mikrotubuli), smjeru u kojem se gibaju duž filamenata te teretu koji nose. Postoje tri velike familije motornih proteina: *miozini*, koji se kreću po aktinskim filamentima i uzrokuju kontrakciju mišića, te *kinezini* i *dineini* koji se kreću po mikrotubulima te imaju bitnu ulogu u formiranju diobenog vretena. Za razliku od miozina, kinezini i dineini se gibaju vrlo usmjereno te mogu putovati stotinu ciklusa ATP hidrolize duž mikrotubula prije nego disociraju (Howard, 2001; Kolomeisky & Fisher, 2007). Upravo zato ove familije motora mogu uspješno prenositi teret s jednog dijela stanice na drugi.

Nama su za ovaj rad od posebnog značaja vezivni proteini koji povezuju mikrotubule u antiparalelni svežanj (kao što je slučaj kod interpolarnih mikrotubula na **slici 1.4**) koje možemo podijeliti u 3 skupine: (i) motorni proteini koji koračaju prema „plus“ kraju mikrotubula te tako uzrokuju klizanje mikrotubula na način da se polovi vretena udaljavaju, (ii) motorni proteini koji koračaju prema „minus“ kraju mikrotubula te uzrokuju klizanje mikrotubula na način da se polovi diobenog vretena približavaju (iii) pasivni proteini koji povezuju mikrotubule bez usmjerenog kretanja.

Najvažniji dio motornog proteina je upravo motorna domena koju još nazivamo „glava“ motora gdje se odvija enzimska aktivnost i koja se snažno veže za specifične molekularne filamente kao što su mikrotubuli. Kao što se vidi na **slici 1.6a**, motorna domena povezana je izduženom strukturom koju zovemo „vrat“ s repnom domenom koja se može vezati na stanični teret kao što su vezikule i organele.

Model koji opisuje gibanje motora po filamentu prikazan je na **slici 1.6b**. Ključna reakcija za ovaj proces 'koračanja' motora po filamentu je hidroliza molekule ATP-a na ADP i fosfatnu skupinu (označena slovom Pi na slici). Ukoliko motor nije vezan na mikrotubul, obje glave motora nalaze se u ADP stanju. Kada se jedna glava motora (žuta glava na **slici 1.6b**) veže na mikrotubul otpušta ADP i ostaje bez nukleotida dok na drugoj glavi, koja se nije vezala na mikrotubul, ostaje vezan ADP (crvena glava). Na glavu koja je vezana na mikrotubul (žuta glava) veže se molekula ATP koja uzrokuje konformacijsku promjenu motora te omogućuje da se stražnja (crvena) glava zarotira ispred prednje glave te tako napravi „korak“. Kada stražnja glava „zakorači“ naprijed, veže se na mikrotubul te otpušta ADP i ostaje bez nukleotida. Sa stražnje (žute) glave otpušta se fosfatna skupina te se odvezuje s mikrotubula. Ponovnim vezanjem ATP-a na prednju glavu proces se ponavlja. Za razliku od motornih proteina, kod

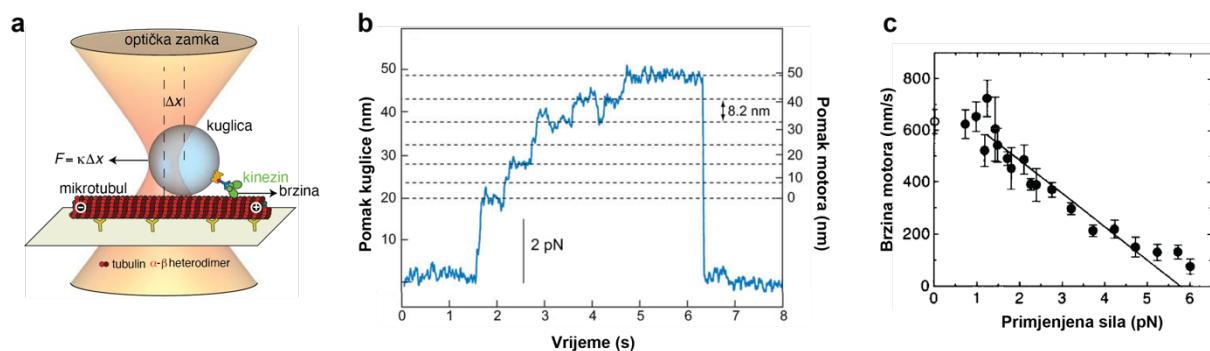
pasivnih vezivnih proteina ne dolazi do hidrolize ATP-a te se ne dešava konformacijska promjena pa je vjerojatnost za koračanje u jednu i drugu stanu jednaka.



**Slika 1.6:** Građa i mehanizam koračanja motornih proteina. **a**, građa motornog proteina kinezina. **b**, mehanizam koračanja motornog proteina: nakon što jedna glava motora dođe u kontakt s mikrotubulom, ona se pričvrsti i oslobađa ADP, dok druga glava zadržava ADP i ostaje odvojena od mikrotubula. Vezanje ATP-a za pričvršćenu glavu uzrokuje strukturnu promjenu koja omogućuje motoru da difuzijskim pretraživanjem prema sljedećim mjestima vezanja napravi „korak“. Nakon što se ta glava veže na prednje mjesto, ADP se oslobađa i ta glava ostaje bez nukleotida. Na stražnjoj, žutoj glavi događa se hidroliza ATP-a i otpušta se fosfatna skupina što uzrokuje odvajanje te glave od mikrotubula. Preuzeto i modificirano iz (Kolomeisky & Fisher, 2007) i (Kawaguchi, 2008).

Mogućnost eksperimentalnog opažanja i aktivnog utjecaja na dinamiku pojedinačnih molekula (osobito nametanjem sila i momenta) pruža moćan alat za istraživanje dinamike motornih proteina. Eksperimentalna metoda koja to omogućuje je optička pinceta (engl. *Optical tweezer*) čija je primjena na molekularni motor kinezin opisana u ref.(Visscher et al., 1999). U ovom pristupu jedan motorni protein je kemijski vezan za malu kuglicu koju hvata fokusirana laserska zraka. Kada se motorni protein spoji na mikrotubul, počne se kretati po njemu stvarajući opterećenje jer pritom povlači kuglicu prema rubu optičke zamke. Budući da je vanjsko

elektromagnetsko polje neuniformno, kuglica je zarobljena blizu žarišne točke u kojoj je svjetlost najintenzivnija. Svaki nanometarski pomak kuglice od žarišne točke proizvodi povratnu silu reda pN (pikonjutt) koja je proporcionalna tom pomaku (proporcionalnost vrijedi za pomake do  $\sim 200$  nm). Stoga, optička zamka djeluje kao kalibrirana Hookeova opruga na motorni protein. Na ovaj način može se proučavati dinamika pojedinačnih molekula motornog proteina te sila koju motorni protein generira. Na **slici 1.7b** prikazani su rezultati takvog eksperimenta u kojem je mjereno pomak za motorni protein kinezin koji se kreće po mikrotubulu. Vezanje motora na mikrotubul detektira se naglim pomakom kuglice za koju je vezan motorni protein u vremenu  $t \approx 1.5$  s (**Slika 1.7b**). U prisutnosti dovoljno ATP-a, motor počinje vući kuglicu iz zamke, ali ne kontinuirano nego nizom diskretnih koraka usmjerenih prema plus kraju mikrotubula. Duljina koraka iznosi približno 8.2 nm što upravo odgovara periodičnosti protofilamenta mikrotubula. Kada se kuglica dalje izvuče iz zamke, sila otpora se povećava, pomak motora postaje konstantan dok se motor u konačnici ne odvoji od kuglice što je vidljivo na **slici 1.7b** u trenutku pri  $t \approx 6,3$  s. Ponavljanje takvog eksperimenta mnogo puta s istom molekulom možemo dobiti srednju brzinu kao funkciju opterećenja. Jedan takav primjer prikazan je na **slici 1.7c** koja prikazuje eksperimentalno izmjerenu ovisnost brzine o sili za motorni protein kinezin. Na **slici 1.7b** brzina motora linearno opada povećanjem opterećenja. Motor se zaustavlja pri sili od otprilike 6 pN. Stoga, za brzinu motora u jednoj dimenziji možemo pisati,  $v = v_0(1 - f/f_0)$ , gdje je  $v_0$  prirodna brzina motora kada na njega ne djeluje sila ( $f = 0$ ), a  $f_0$  je zaustavna sila.



**Slika 1.7:** **a**, Shema eksperimenta optičkom pincetom u kojem se fokusiranim laserskim snopom zarobi kuglicu na kojoj je vezan motorni protein kinezin. Kada se kinezin veže na mikrotubul i krene hodati po njemu, pomakne kuglicu iz centra laserskog snopa pri čemu se javlja sila koja se tome opire. Shema modificirana iz (Bormuth et al., 2009). **b**, Pomak kuglice u ovisnosti o vremenu za  $20\mu\text{M}$  ATP-a. Preuzeto iz (Higuchi et al., 1997). **c**, Ovisnost brzine i sile za  $2\text{mM}$  ATP-a preuzeto iz (Svoboda & Block, 1994). Točke predstavljaju eksperimentalne podatke, a crna linija fit na eksperimentalne podatke.

Ove eksperimentalne tehnike omogućuju nam proučavanje dinamike jednog molekularnog motora s visokom prostornom i vremenskom rezolucijom, a rezultati koje daju u kombinaciji s teorijskim modeliranjem omogućuju nam bolje razumijevanje sustava u kojima su motorni proteini glavni generatori sila.

### 1.3.2 Samoorganizacija diobenog vretena

Podjelom genetskog materijala u novonastale stanice kćeri diobeno vreteno se raspada, te se potom na početku sljedećeg ciklusa iznova formira. Proces formiranja ispravnog bipolarnog vretena esencijalno je za preciznu podjelu kromosoma. Stoga, ovdje je potrebno obrazložiti dva koncepta: samoorganizaciju diobenog vretena i sile u diobenom vretenu.

Diobeno vreteno nastaje samoorganizacijom mikrotubula i kromosoma koja se dešava kroz 2 glavna procesa: formiranje svežnjeva mikrotubula te uspostavljanje interakcije između mikrotubula i kinetohora. Tijekom formiranja svežnjeva mikrotubula, dva mikrotubula koji su početno međusobno udaljeni, u konačnici se približavaju jedan drugome te međusobno interagiraju putem vezivnih proteina. Slično tome, da bi se kromosom integrirao u diobeno vreteno, kinetohora na kromosomu i mikrotubul moraju doći blizu jedan drugome kako bi ju mikrotubul mogao „uhvatiti“ (Pavin & Tolic, 2016).

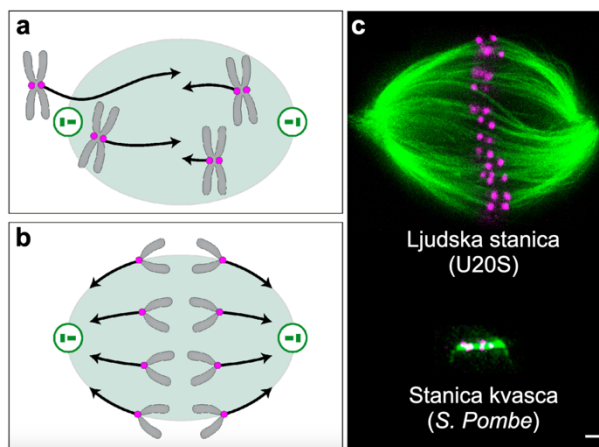
Jedna od prvih ideja koja objašnjava kako mikrotubuli iz jednog pola diobenog vretena nađu mikrotubule koji se protežu iz drugog pola diobenog vretena zasnovana je na dinamici mikrotubula te njihovoj izotropnoj nukleaciji iz polova. Prema toj ideji, mikrotubuli iz oba pola rastu i skraćuju se u nasumičnim smjerovima. Na ovaj način može se desiti da se mikrotubul iz jednog pola nađe blizu mikrotubulu s drugog pola što omogućuje motornim proteinima da se vežu na mjestu preklopa. Ideja koja objašnjava način na koji se mikrotubuli vežu za kinetohoru kondenzirana je u terminu „search-and-capture“, a bazirana je na dinamici mikrotubula i njihovoj nukleaciji na polovima diobenog vretena. Mikrotubuli rastu iz centrosoma u nasumičnim smjerovima te na taj način pretražuju prostor u potrazi za kinetohorama (Kirschner & Mitchison, 1986; Wollman et al., 2005). No teorijska istraživanja pokazala su da je vrijeme uhvata kinetohora bazirano na ovoj ideji presporo. Dodatna istraživanja pokazala su da osim rasta i skraćivanja, mikrotubuli također obavljaju nasumično kutno gibanje koje pokreću termalne sile. Jednostavan teorijski model koji uključuje nasumično gibanje mikrotubula i kinetohora, kao glavnu predikciju daje da brzina uhvata kinetohora dominantno ovisi o brzini nasumičnog kutnog gibanja mikrotubula. Ovaj rezultat je eksperimentalno potvrđen perturbacijom brzine nasumičnog gibanja mikrotubula te mjerenjem vremena uhvata kinetohora (Kalinina et al., 2012).



Općenito je poznato da je kretanje kromosoma posljedica sila koje nastaju u diobenom vretenu, a glavni generatori sila su mikrotubuli i molekularni motori. Prilikom formiranja diobnog vretena sile su koordinirane tako da kromosome koji su u nasumičnim pozicijama poredaju u ekvatorijalnu ravninu, da bi potom transportirale sestrinske kromatide prema suprotnim polovima odnosno budućim stanicama kćerima, **slika 1.8a, b**. Stoga je precizna regulacija smjera i veličine sila u prostoru i vremenu presudna za pravilnu segregaciju kromosoma.

Sile u diobenom vretenu važne su ne samo za pokretanje kromosoma, već i za definiranje karakterističnog oblika diobnog vretena. Vretena dolaze u različitim oblicima ovisno o vrsti i tipu stanice. Tako primjerice, diobno vreteno u životinjskim i ljudskim stanicama ima složenu arhitekturu pri čemu su brojni svežnjevi mikrotubula organizirani u prepoznatljivu strukturu vretenastog oblika. Nasuprot tome, diobno vreteno nižih eukariota, kao što su kvasci, sastoji se od jednog svežnja mikrotubula koji povezuje polove diobnog vretena (**slika 1.8c**). Varijacije u geometriji, pa tako i veličini, diobnog vretena optimizirane su za svaki organizam kako bi njegova funkcija bila što efikasnija i preciznija.

Usprkos različitostima u geometriji i veličini, diobno vreteno kvasca po mnogo čemu je slično onome u ljudskim stanicama, kao primjerice funkciji samog vretena te njegovim građevnim elementima. Mnogi motorni i drugi proteini karakteristični za ljudske stanice prisutni su i u diobenom vretenu stanica kvasca. Veliki broj mikrotubula u diobenom vretenu ljudskih stanica čini eksperimentalno opažanje svežnjeva mikrotubula vrlo izazovnim, a kompleksna geometrija otežava teorijsko modeliranje. Stoga je diobno vreteno kvasca, zbog svoje jednostavne geometrije te manjeg broja mikrotubula vrlo pogodno kako za eksperimentalno opažanje formiranja svežnjeva mikrotubula tako i za teorijsko modeliranje tog procesa.



**Slika 1.8:** Sile na kromosome i različiti oblici diobenog vretena. **a**, sile koje djeluju na početku mitoze koje poravnavaju kromosome u centar vretena. **b**, sile koje djeluju na kromosome prilikom njihovog razdvajanja. **c**, diobeno vreteno ljudske stanice i stanice kvasca, *Schizosaccharomyces Pombe*. Preuzeto i modificirano iz (Tolić et al., 2019).

### 1.3.3 Modeli formiranja diobenog vretena

Diobeno vreteno fascinira ljude od trenutka kad su ga prvi put eksperimentalno opazili, a prve skice tih diobenih vretena nastale su prije više od 100 godina (Flemming, 1882). Mnoga istraživanja doprinijela su boljem razumijevanju nekih segmenata diobenog vretena no zbog kompleksnosti samog problema mnoga pitanja su i dalje otvorena. U ovom poglavlju dat ću pregled glavnih teorijskih modela formiranja diobenog vretena u raznim modelnim organizmima.

Jedna od prethodnih teorijskih studija istraživala je formiranje antiparalelnih svežnjeva mikrotubula u kontekstu diobenog vretena koristeći kompjuterske simulacije koje uključuju dva pola diobenog vretena iz kojih rastu mikrotubuli u nasumičnim smjerovima te motorne proteine koji se mogu vezati na njih. Autori su pokazali da slučajevi koji uključuju motore koji se gibaju u oba smjera mogu rezultirati strukturama koje podsjećaju na diobeno vreteno (Loughlin et al., 2010; Nédélec, 2002). Kombinacija motora različitih usmjerenja gibanja uključena je i u model nastanka diobenog vretena u embriju mušice *Drosophila* (Cytrynbaum et al., 2003, 2005). Ovo je model ravnoteže sila u kojem motori na staničnoj kori kao i motori na antiparalelnim svežnjevima koji koračaju prema „minus“ kraju mikrotubula stvaraju sile koje razdvajaju polove diobenog vretena. Tim silama suprotstavlja se sila koju generiraju motori koji se kreću prema „plus“ kraju mikrotubula u istom antiparalelnom preklopu. Samoorganizacija diobenog vretena proučavana je i u ekstraktu jajašca žabe *Xenopus*. Model koji je relevantan za taj sustav zove se engl. *slide-and-cluster* model u kojem se mikrotubuli nukleiraju blizu kromosoma nakon čega molekularni motori prenose mikrotubule prema

polovima gdje se usporavaju i grupiraju (Brugués et al., 2012; Burbank et al., 2007). Specifičnost ovog diobenog vretena je što umjesto dobro definiranih svežnjeva mikrotubula ima puno kratkih mikrotubula koji imaju kontinuiranu dinamiku između kinetohora i polova koju pokreću molekularni motori. Stoga je za opis ovakvog sustava prikladno koristiti teoriju tekućih kristala (Brugués & Needleman, 2014).

Formiranje diobenog vretena istraživano je i u stanicama kvasca. Istraživanja na stanicama pivskog kvasca *Saccharomyces Cerevisiae* pokazala su da stanice kojima nedostaju motori kinezina-14 imaju manje antiparalelnih snopova u vretenu od neperturbiranih stanica (Hepperla et al., 2014). Ovo je objašnjeno modelom u kojem mikrotubuli rastu u nasumičnim smjerovima iz dva pola diobenog vretena te se na njima mogu spojiti molekularni motori kinezina-14. Iscrpnim kompjuterskim simulacijama istraživano je diobeno vreteno u kvascu *Schizosaccharomyces Pombe*, odnosno autori su istraživali kako se početna monopolarna struktura razvije u bipolarno diobeno vreteno. Ovim kompjuterskim simulacijama pokazano je da je za formiranje bipolarne strukture diobenog vretena nužno uključiti dinamiku mikrotubula, aktivne motore koje se kreću prema „plus“ i one koji se kreću prema „minus“ kraju mikrotubula kao i pasivne proteine (Blackwell et al., 2017). Također je istaknuto da su antiparalelni svežnjevi ključni strukturni elementi koji omogućuju formiranje i stabilnost bipolarnog vretena. Kombinacijom eksperimenata i simulacija kasnije je pokazano da se bipolarno diobeno vreteno može formirati bez prisustva aktivnih motora, u tom slučaju glavnu ulogu ima dinamika mikrotubula te pasivni proteini (Lamson et al., 2019; Rincon et al., 2017).

Usprkos mnoštvu istraživanja i dalje ostaje nejasno koji su glavni procesi formiranja antiparalelnog svežnja koji je ključan element diobenog vretena kako u stanicama kvasca tako i u ljudskim stanicama.

## 2 Matematički alati za sustave sa šumom

Jedna od važnih karakteristika stanične unutrašnjosti koja je čini toliko različitom od svijeta našeg svakodnevnog iskustva je činjenica da su termalne i determinističke sile u ravnopravnom položaju. Pod termalnim silama nazivamo sile koje djeluju na makromolekularne strukture kao rezultat neprestanog gibanja svih molekula koje ih okružuju. Budući da su termalne sile nasumične, za teorijski opis procesa unutar stanice moramo razumjeti stohastičke procese koji opisuje evoluciju dinamičkog sustava u vremenu koji je pokretan šumom.

### 2.1 Stohastički procesi

#### 2.1.1 Nasumične varijable

Nasumična varijabla je objekt  $X$  definiran sa setom mogućih vrijednosti  $\{x_1, \dots, x_n\}$  i gustoćom vjerojatnosti preko tog seta (Jacobs, 2010; van Kampen, 2007). Recimo da je  $X$  vrijednost koju dobijemo bacanjem kockice, u tom slučaju moguće vrijednosti od  $X$  su 1, 2, ..., 6. Svaka od ovih vrijednosti može se ostvariti s određenom vjerojatnosti  $p_n$  (skraćeno od  $p(x_n)$ ). Različite vrijednosti  $X$ , i bilo koje nasumične varijable, primjer su međusobno isključivih događaja. Odnosno, kad god bacimo kockicu,  $X$  može imati samo jednu od vrijednosti između 1 i 6. Dakle, zbroj vjerojatnosti za sve međusobno isključive moguće vrijednosti uvijek mora biti jedinica,  $\sum_{n=1}^6 p_n = 1$ . Ako je kockica poštena, tada su sve moguće vrijednosti jednako vjerojatne, pa je stoga svaka jednaka  $1/6$ .

U gornjem primjeru,  $X$  je diskretna nasumična varijabla. No, ukoliko vrijednost varijable  $X$  može biti bilo koji broj iz skupa realnih brojeva, onda je  $X$  kontinuirana nasumična varijabla. Kao u diskretnom slučaju, svakoj vrijednosti koju  $X$  može imati pripisujemo određenu vjerojatnost. Ta vjerojatnost, u slučaju kada imamo kontinuirani jednodimenzionalni set, je funkcija od  $x$  (gdje se  $x$  kreće preko vrijednosti koje  $X$  može poprimiti) i nazivamo ju gustoća vjerojatnosti,  $P(X(t) = x)$ . Vjerojatnost da  $X$  poprimi vrijednost u rasponu od  $x = a$  do  $x = b$  dana je površinom ispod funkcije  $P(x)$ ,  $Pr(a \leq X \leq b) = \int_a^b P(x)dx$ . Pri tome, funkcija  $P(x)$  zadovoljava dva svojstva, (i) nenegativna je  $P(x) \geq 0$ , za svaki  $x$  i (ii) integral od  $P(x)$  po svim realnim brojevima (od  $-\infty$  do  $\infty$ ) mora biti 1, jer  $X$  mora imati jednu od tih vrijednosti:  $\int_{-\infty}^{\infty} P(x)dx = 1$ .

Srednja ili očekivana vrijednost bilo koje funkcije  $f(X)$  definirana je kao  $\langle f(X) \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} f(x)P(x)dx$ . Varijanca od  $X$  definirana je kao  $V_X = \langle (X - \langle X \rangle)^2 \rangle = \langle X^2 \rangle - \langle X \rangle^2$ .

Standardna devijacija od  $X$ ,  $\sigma_X$ , definirana je kao drugi korijen od varijance i općenito predstavlja širinu gustoće vjerojatnosti, odnosno to je mjera koja nam govori koliko  $X$  može odstupati od svoje srednje vrijednosti.

**Nasumični šetač u jednoj dimenziji.** Sada možemo izračunati srednji položaj i varijancu nasumičnog šetača u jednoj dimenziji. U ovom primjeru uzimamo da je vrijeme diskretno ( $t = 0, 1, 2, \dots$ ) te u svakom vremenskom koraku šetač može napraviti jedan korak. Svakom koraku nasumičnog šetača pridružujemo nasumičnu varijablu  $X_j$  ( $j = 1, 2, \dots, t$ ) koja može imati vrijednost 1 za korak u desno ili -1 za korak u lijevo, oboje s vjerojatnosti 1/2. Pozicija nasumičnog šetača nakon vremena  $t$  bit će zbroj svih prethodnih koraka  $Y_t = \sum_{j=1}^t X_j$ . Srednja vrijednost položaja nakon vremena  $t$  iznosi  $\langle Y_t \rangle = \langle \sum_{j=1}^t X_j \rangle = \sum_{j=1}^t \langle X_j \rangle$ , a budući da je  $\langle X_j \rangle = \frac{1}{2}(1) + \frac{1}{2}(-1) = 0$  dobijemo da je očekivani položaj nakon  $t$  koraka jednak 0. Varijancu ovog procesa računamo na sljedeći način,  $V(Y_t) = \langle Y_t^2 \rangle + \langle Y_t \rangle^2 = \langle Y_t^2 \rangle$ . Ako sada uvrstimo definiciju za  $Y_t$  dobivamo  $\langle Y_t^2 \rangle = \langle (\sum_{j=1}^t X_j)^2 \rangle$ . Budući da vrijedi  $\langle X_j X_{j'} \rangle = \langle X_j \rangle \langle X_{j'} \rangle = 0$  (za  $j \neq j'$  jer su  $X_j$  i  $X_{j'}$  neovisni) i  $\langle X_j^2 \rangle = \frac{1}{2}(1)^2 + \frac{1}{2}(-1)^2 = 1$  konačno za varijancu dobivamo  $\langle Y_t^2 \rangle = t$ . Ovime smo izveli dva glavna svojstva nasumičnog šetača, (1) usrednjeni položaj nasumičnog šetača je 0 i (2) varijanca se povećava linearno s vremenom.

Stohastički procesi proučavaju nasumične varijable koje se mijenjaju u vremenu. Glavno pitanje na koje želimo odgovoriti je, koja je vjerojatnost da proces proizvede određenu trajektoriju. Vjerojatnost određene trajektorije dana je sljedećim izrazom

$$P(x_1, t_1; x_2, t_2; \dots; x_n, t_n) = P(X(t_1) = x_1; X(t_2) = x_2; \dots; X(t_n) = x_n) \quad (2.1)$$

za  $t_1 \leq t_2 \leq \dots \leq t_n$ . Generička svojstva koja vrijede za sve stohastičke procese su: (i) gustoća vjerojatnosti ima ne-negativnu vrijednost,  $P(x_1, t_1; x_2, t_2; \dots; x_n, t_n) \geq 0$ , (ii) sumiranjem gustoće vjerojatnosti preko određene varijable (u ovom slučaju  $x_n$ ) mičemo utjecaj te varijable na gustoću vjerojatnosti i dobivamo marginalnu distribuciju,  $\int dx_n P(x_1, t_1; x_2, t_2; \dots; x_n, t_n) = P(x_1, t_1; x_2, t_2; \dots; x_{n-1}, t_{n-1})$ , (iii) gustoća vjerojatnosti je normalizirana,  $\int dx_s P(x_s, t_s) = 1$ ,  $\forall s$ . Ako su ovi uvjeti ispunjeni tada je promatrani proces stohastički proces. Budući da stohastičke procese karakterizira beskonačna hijerarhija vjerojatnosti, računanje cijele trajektorije predstavlja izazov. Stoga uvodimo pojednostavljenja.

## 2.1.2 Markovljevo svojstvo

Markovljevi procesi su podskup stohastičkih procesa koji imaju veliku važnost u fizici. Ove procese odlikuje Markovljevo svojstvo koje, pojednostavljenim jezikom, kaže da ishod u sljedećem koraku ovisi samo o sadašnjem stanju sustava, a ne i o prethodnim koracima. Dakle, Markovljev proces je proces koji ne pamti prošlost. Formalno je Markovljevo svojstvo definirano kao

$$P(x_n, t_n | x_1, t_1; x_2, t_2; \dots; x_n, t_n) = P(x_n, t_n | x_{n-1}, t_{n-1}). \quad (2.2)$$

Odnosno, uvjetna vjerojatnost u trenutku  $t_n$  jedinstveno je definirana vrijednošću  $x_{n-1}$  u trenutku  $t_{n-1}$  te ne ovisi o poznavanju vrijednosti u ranijim trenucima (van Kampen, 2007).

Markovljev proces potpuno je određen s dvije funkcije,  $P(x_1, t_1)$  i  $P(x_2, t_2 | x_1, t_1)$  te cijela hijerarhija može biti konstruirana iz njih. Primjerice, za  $t_1 < t_2 < t_3$ , koristeći Bayesovo pravilo  $P(A, B) = P(A)P(B|A)$  te Markovljevo svojstvo (jednadžba (2.2)) imamo

$$\begin{aligned} P(x_1, t_1; x_2, t_2; x_3, t_3) &= P(x_1, t_1; x_2, t_2)P(x_3, t_3 | x_1, t_1; x_2, t_2) \\ &= P(x_1, t_1; x_2, t_2)P(x_3, t_3 | x_2, t_2) \\ &= P(x_1, t_1)P(x_2, t_2 | x_1, t_1)P(x_3, t_3 | x_2, t_2) \end{aligned} \quad (2.3)$$

Sada je ovo jednostavno generalizirati na  $n$  varijabli,

$$P(x_1, t_1; x_2, t_2; \dots; x_n, t_n) = P(x_1, t_1) \prod_{i=1}^{n-1} P(x_{i+1}, t_{i+1} | x_i, t_i). \quad (2.4)$$

Uz poznavanje funkcija  $P(x_1, t_1)$  i  $P(x_2, t_2 | x_1, t_1)$ , da bi Markovljev proces bio jedinstveno definiran moraju biti zadovoljena sljedeća ograničenja: (1) **Marginalizacija**,

$$P(x_2, t_2) = \int P(x_1, t_1; x_2, t_2) dx_1 = \int P(x_1, t_1)P(x_2, t_2 | x_1, t_1) dx_1. \quad (2.5)$$

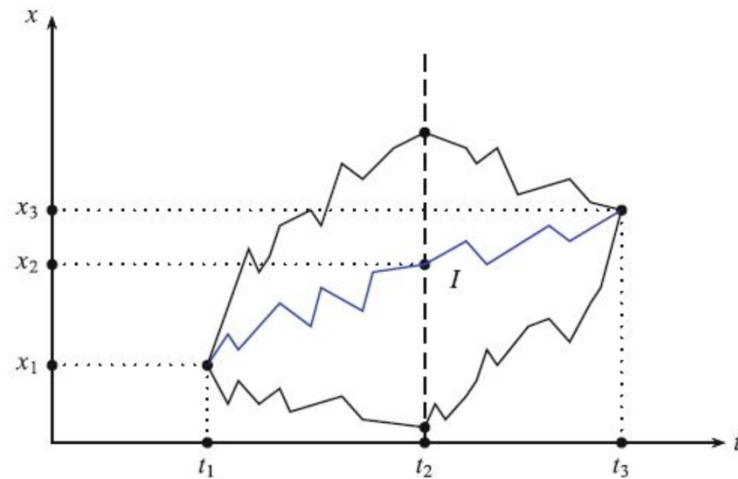
(2) **Chapman Kolmogorov jednadžba**, uzmimo u obzir 3 vremenske točke  $t_1, t_2$  i  $t_3$ . Ako sada integriramo jednadžbu (2.3) po  $x_2$  dobivamo

$$P(x_1, t_1; x_3, t_3) = P(x_1, t_1) \int P(x_3, t_3 | x_2, t_2)P(x_2, t_2 | x_1, t_1) dx_2. \quad (2.6)$$

Lijevu stranu jednadžbe prema Bayesovom pravilu možemo napisati kao  $P(x_1, t_1; x_3, t_3) = P(x_1, t_1)P(x_3, t_3 | x_1, t_1)$ . Sada obje strane možemo podijeliti sa  $P(x_1, t_1)$  i dobivamo

$$P(x_3, t_3 | x_1, t_1) = \int P(x_3, t_3 | x_2, t_2)P(x_2, t_2 | x_1, t_1) dx_2. \quad (2.7)$$

Ovaj izraz zove se Chapman Kolmogorov jednadžba i jako je važna jer sve prijelazne vjerojatnosti moraju poštivati ovu jednadžbu ukoliko se radi o Markovljevom procesu. Intuitivno, Chapman Kolmogorov jednadžba uzima u obzir sve međukorake (u ovom slučaju sve položaje  $x_2$  u trenutku  $t_2$ ) preko kojih možemo stići iz početnog do konačnog položaja (u ovom slučaju iz  $x_1$  do  $x_3$ ) ukoliko vrijedi  $t_1 \leq t_2 \leq t_3$  (**slika 2.1**). Ovo vrijedi za bilo koje početne i konačne položaje.

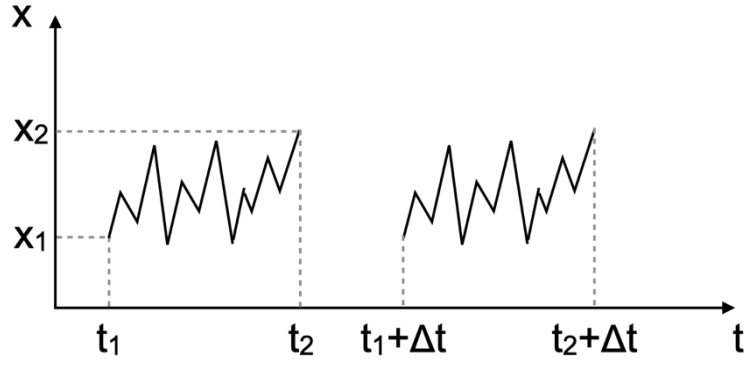


**Slika 2.1:** Ilustracija Chapman Kolmogorov jednadžbe. Modificirano iz (Chiarella et al., 2015).

### 2.1.3 Stacionarni procesi

Krenimo od jednostavnog primjera stacionarnog procesa. Imamo novčić i bacamo ga danas s nekim vjerojatnostima da padne pismo ili glavu. Ako bacim novčić ponovo sutra, vjerojatnosti da padne pismo ili glava će biti nepromijenjene u odnosu na jučer. Uzmimo trajektoriju nekog stohastičkog procesa koja počinje u vremenu  $t_1$  na poziciji  $x_1$  te završava u trenutku  $t_2$  na poziciji  $x_2$  (**slika 2.2**). Vjerojatnost da se ova trajektorija realizira u vremenskom intervalu  $t_1, t_2$  je jednaka vjerojatnosti da se ista trajektorija realizira u istom vremenskom intervalu pomaknutom za  $\Delta t$ , odnosno  $t_1 + \Delta t, t_2 + \Delta t$ .

$$P(x_1, t_1; x_2, t_2; \dots; x_n, t_n) = P(x_1, t_1 + \Delta t; x_2, t_2 + \Delta t; \dots; x_n, t_n + \Delta t). \quad (2.8)$$



*Slika 2.2: Ilustracija stacionarnog procesa.*

Odnosno, u stacionarnom procesu vrijedi sljedeće,

$$P(x_s, t_s) = P(x_s, t_s + \Delta t), \quad (2.9)$$

za bilo koji  $\Delta t > 0$ . Za  $\Delta t$  koji je jako mali ovaj uvjet se može zapisati kao  $\partial_t P(x, t) = 0$  i ovo je nužan uvjet stacionarnosti (van Kampen, 2007).

Ako uz stacionarnost, proces zadovoljava i Markovljevo svojstvo onda prijelazne vjerojatnosti ne ovise o dva vremenska trenutka nego samo o vremenskom intervalu,  $\tau = t_2 - t_1$ , stoga za prijelazne vjerojatnosti uvodimo notaciju  $P(x_2, t_2 | x_1, t_1) = T_\tau(x_2 | x_1)$ . Sada za stoacionarni Markov proces možemo pisati

$$P(x_1, t_1; x_2, t_2; \dots; x_n, t_n) = P(x_1) T_\tau(x_2 | x_1) T_\tau(x_3 | x_2) \dots T_\tau(x_n | x_{n-1}). \quad (2.10)$$

Ova jednadžba vrijedi ukoliko se vremena povećavaju  $t_1 < t_2 < \dots < t_n$  te ukoliko su vremenski intervali između susjednih vremena jednako dugački,  $\tau = t_n/n$ . Budući da je Chapman Kolmogorov jednadžba bitan uvjet koji Markovljevi procesi moraju zadovoljavati, valja istaknuti oblik te jednadžbe u slučaju stacionarnog procesa,

$$T_{\tau+\tau'}(x_3 | x_1) = \int T_{\tau'}(x_3 | x_2) T_\tau(x_2 | x_1) \quad (2.11)$$

gdje je  $\tau' = t_3 - t_2$  i  $\tau = t_2 - t_1$ .

#### 2.1.4 Master jednadžba

Master jednadžba opisuje kako vjerojatnost ( $P(x, t)$  u kontinuiranom slučaju ili  $p_n(t)$  u diskretnom slučaju) ovisi o vremenu i o elementima matrice prijelaza. Odnosno, master jednadžba opisuje vremensku evoluciju vjerojatnosti. Kako bismo izveli master jednadžbu krenut ćemo od prijelazne vjerojatnosti za slučaj kada je  $\tau$  jako mali,

$$T_\tau(x_2 | x_1) \approx (1 - \Gamma(x_1)\tau)\delta(x_2 - x_1) + W(x_2 | x_1)\tau. \quad (2.12)$$



Prvi član ove jednadžbe odgovara vjerojatnosti da sustav ostane u  $x_1$ , gdje je  $\Gamma(x_1)$  vjerojatnost prijelaza sustava iz pozicije  $x_1$  u bilo koju drugu poziciju, odnosno vjerojatnost 'bijega' sustava iz pozicije  $x_1$ . Vjerojatnost 'bijega' definirana je kao  $\Gamma(x_1) = \int W(x_2|x_1)dx_2$  gdje je  $W(x_2|x_1)$  vjerojatnost prijelaza sustava iz početne pozicije,  $x_1$ , u poziciju  $x_2$ . Primijetite da integriramo po svim vrijednostima  $x_2$  budući da je jedino bitno da sustav više nije u  $x_1$ . Stopa prijelaza iz  $x_1$  u  $x_2$  definirana je kao prijelazna vjerojatnost u jedinici vremena,  $W(x_2|x_1) \equiv \lim_{\tau' \rightarrow 0} \frac{T_{\tau+\tau'}(x_2|x_1) - T_\tau(x_2|x_1)}{\tau'} = \frac{\partial T_\tau(x_2|x_1)}{\partial \tau}$ .

Sada kad razumijemo izraz za prijelaznu vjerojatnost (jednadžba (2.12)), možemo ekvivalentan izraz uvrstiti na mjesto prijelazne vjerojatnosti  $T_{\tau'}(x_3|x_2)$  u Chapman Kolmogorov jednadžbi (jednadžba (2.11)),

$$T_{\tau+\tau'}(x_3|x_1) = (1 - \Gamma(x_3)\tau')T_\tau(x_3|x_1) + \tau' \int W(x_3|x_2) T_\tau(x_2|x_1)dx_2. \quad (2.13)$$

Ako sada član  $T_\tau(x_3|x_1)$  prebacimo na lijevo stranu te cijelu jednadžbu podijelimo sa  $\tau'$  dobivamo,

$$\frac{\partial T_\tau(x_3|x_1)}{\partial \tau} = \int \{W(x_3|x_2)T_\tau(x_2|x_1) - W(x_2|x_3)T_\tau(x_3|x_1)\}dx_2. \quad (2.14)$$

Ovaj diferencijalni oblik Chapman Kolmogorov jednadžbe zove se master jednadžba. Poznatiji oblik iste jednadžbe dobijemo ukoliko jednadžbu (2.13) pomnožimo sa  $P(x_1)$  i integriramo preko  $x_1$  te uz supstitucije  $x_3 = x$ ,  $x_2 = x'$  i  $\tau = t$  dobijemo,

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = \int \{W(x|x')P(x', t) - W(x'|x)P(x, t)\}dx'. \quad (2.15)$$

U slučaju kada je  $X$  diskretan set od  $n$  stanja master jednadžba poprima oblik,

$$\frac{\partial p_n(t)}{\partial t} = \sum_n \{W_{nn'}p_{n'}(t) - W_{n'n}p_n(t)\}. \quad (2.16)$$

Iz ove forme jednadžbe jasno je da je master jednadžba, jednadžba dobitaka (prvi član) i gubitaka (drugi član) za vjerojatnosti  $n$  različitih stanja. Prvi član opisuje dobitke stanja  $n$  koji su posljedica prelaska sustava iz drugih stanja  $n'$ , dok drugi član opisuje gubitke zbog prelaska sustava iz stanja  $n$  u druga stanja (van Kampen, 2007).

## 2.2 Stohastičke diferencijalne jednadžbe

Promotrimo za početak jednadžbu u kojoj je vrijeme podijeljeno na konačne (ne infinitezimalne) vremenske inkremente  $\Delta t$ . Tijekom tog vremenskog inkrementa,  $x$  se

promijeni za  $\Delta x$ . Budući da se radi o jednadžbi s diskretnim vremenom,  $x$  se evaluira u vremenskim trenucima  $t_n = n\Delta t$ , gdje je  $n = 0, 1, \dots, \infty$ . Općenito, promjenu varijable  $x$  možemo pisati kao sumu dva člana, jednog koji je funkcija od  $x$  i drugog koji je neovisan o  $x$ ,

$$\Delta x(t_n) = f(x(t_n))\Delta t + g(t_n)\Delta t \quad (2.17)$$

Inkrement od  $x$  definiran je kao  $\Delta x(t_n) \equiv x(t_n + \Delta t) - x(t_n)$ . Stoga, ako gornju jednadžbu podijelimo sa  $\Delta t$  i odemo u limes  $\Delta t \rightarrow 0$  dobivamo

$$\dot{x} = f(x) + g(t). \quad (2.18)$$

Gornja jednadžba predstavlja običnu diferencijalnu jednadžbu za  $x$  koja nam govori kako se  $x$  mijenja u svakom infinitezimalnom vremenskom koraku  $dt$  (Jacobs, 2010). U ovoj jednadžbi, inkrement od  $x$  je deterministički, što znači da u svakoj vremenskoj točki možemo predvidjeti vrijednost od  $x$  na temelju jednadžbe (2.18). No, što ako član  $g(t)$  ima nasumične vrijednosti za svaki vremenski trenutak  $t_n$ ? U tom slučaju drugi član predstavlja šum sustava i obično se označava sa  $\xi(t)$  pa ekvivalentna jednadžba koja opisuje stohastički proces glasi  $\dot{x} = f(x) + \xi(t)$ . Ovu jednadžbu je za daljnje izvode korisno napisati u diferencijalnoj formi

$$dx = f(x)dt + \xi(t)dt. \quad (2.19)$$

Ovo je stohastička diferencijalna jednadžba koja se sastoji od determinističkog člana,  $f(x)$ , i nasumičnog člana (šuma),  $\xi(t)$ . Nasumičnu vrijednost varijable  $\xi(t)$  dobivamo iz distribucije vjerojatnosti (primjerice Gaussove). Budući da za svaki vremenski trenutak varijabli  $x$  dodajemo vrijednost šuma, više ne možemo predvidjeti kolika će biti vrijednost od  $x$  u nekom budućem vremenu  $T$  dok ne dođemo do tog vremenskog trenutka i dok sve prijašnje vrijednosti nasumičnog inkrementa ne budu poznate.

### 2.2.1 Wienerov proces

Jednadžba koja opisuje ovaj proces sastoji se samo od šuma,  $\dot{x} = \xi(t)$ . Ovdje će biti korisno zapisati ovu jednadžbu u sljedećem obliku

$$dx = \xi(t)dt = dW. \quad (2.20)$$

Ovaj šum se obično naziva Wienerov šum i označuje se s  $dW$ . U slučaju diskretnog vremena jednadžba za inkrement od  $x$  imala bi sljedeći oblik,  $\Delta x(t_n) = x(t_{n+1}) - x(t_n) = \Delta W(t_n)$ . U ovom slučaju,  $\Delta W(t_n)$  je Wienerov inkrement. Svaki Wienerov inkrement je potpuno neovisan o ostalima i svi dolaze iz iste distribucije,

$$P(\Delta W) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\Delta t}} e^{-\Delta W^2/2\Delta t}. \quad (2.21)$$

Ovo je Gaussova distribucija sa srednjom vrijednosti 0 i varijancom  $\Delta t$ . Pogledajmo koje su posljedice nasumičnog inkrementa tako da izračunamo srednju vrijednost i varijancu od  $x_n$ ,

$$\langle x_n \rangle = \left\langle \sum_{i=0}^{n-1} \Delta W_i \right\rangle = \sum_{i=0}^{n-1} \langle \Delta W_i \rangle = 0 \quad (2.22)$$

$$\text{Var}(x_n) = \sum_{i=0}^{n-1} \text{Var}(\Delta W_i) = \sum_{i=0}^{n-1} \Delta t = n\Delta t = t. \quad (2.23)$$

Sada možemo vidjeti da smo upravo dobili svojstva Brownovog gibanja, što ima smisla jer jedino šum pokreće sustav. Ovdje je također bitno primijetiti da je proporcionalnost varijance od  $x$  vremenu  $t$ , direktna posljedica toga što smo za varijancu od Wienerovog inkrementa izabrali  $\Delta t$ . Budući da za svaki vremenski inkrement  $\Delta t$  imamo jedan Wienerov inkrement, varijanca od  $x$  također raste za  $\Delta t$  u svakom vremenskom intervalu  $\Delta t$  te je stoga proporcionalna s  $t$ .

Pogledajmo sada što dobivamo u granici kontinuuma kada broj vremenskih koraka  $N \rightarrow \infty$ , odnosno  $\Delta t = t/N \rightarrow 0$ .

$$x(t) = \lim_{N \rightarrow \infty} x_N = \sum_{i=0}^{N-1} \Delta W_i \equiv \int_0^t dW(s) = W(t) \quad (2.24)$$

U ovoj jednadžbi definirali smo stohastički integral,  $W(t) = \int_0^t dW(s)$  kao integral svih inkremenata Wienerovog procesa. Budući da integriramo puno nasumičnih varijabli, sam integral će također biti nasumična varijabla. U mnogo slučajeva moći ćemo izračunati distribuciju vjerojatnosti za tu nasumičnu varijablu (stohastički integral).

U kontinuiranom limitu generalna stohastička diferencijalna jednadžba ima oblik

$$dx = f(x, t)dt + g(x, t)dW. \quad (2.25)$$

Budući da je varijanca od  $dW$  mora biti proporcionalna sa  $dt$ , a konstante proporcionalnosti mogu biti apsorbirane u  $g(x, t)$ , varijanca od  $dW$  definira se kao egzaktno jednaka  $dt$ .

Kao primjer možemo uzeti Brownovo gibanje za koje vrijedi  $f(x, t) = 0$  i  $g(x, t) = \sqrt{2D}$ , gdje  $D$  označava difuziju. Ako to sada uvrstimo u jednadžbu (2.25) dobivamo  $dx = \sqrt{2D}dW$ , odnosno  $x(t) = \sqrt{2D}W(t)$ . Iz ovoga možemo dobiti vjerojatnost da se nađemo u položaju  $x$  u vremenu  $t$ ,  $P(x, t) = \left(\frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}}\right) e^{-x^2/4Dt}$ .

Zašto Gaussov šum? Gaussov šum je vrlo čest slučaj u fizikalnim sustavima. Glavni razlog je centralni granični teorem koji kaže da ako zbrajano neovisne nasumične varijable,

tada će distribucija vjerojatnosti te sume biti približno Gaussova distribucija. Kako broj varijabli u sumi teži beskonačnosti, rezultirajuća distribucija će težiti egzaktnoj Gaussovoj distribuciji. Jedini uvjet ovog teorema je da nasumične varijable koje sumiramo imaju konačnu varijancu. Promotrimo šum koji dolazi primjerice od utjecaja individualnih molekula na neki objekt u stanici. Ukupna sila kojom te molekule djeluju na objekt bit će jednaka sumi nasumičnih doprinosa svake molekule i zbog toga će ukupna sila imati Gaussovu distribuciju (Jacobs, 2010).

## 2.2.2 Ito lema

Kada radimo sa infinitezimalnim inkrementima najčešće možemo ignorirati članove drugog i višeg reda, što nas također dovodi do uobičajenih pravila za diferencijalne jednačbe. U ovom poglavlju ćemo pokazati da drugu potenciju stohastičkog diferencijala  $dW$  ne možemo zanemariti pa stoga moramo naučiti nova pravila za manipulaciju stohastičkih diferencijalnih jednačbi.

Rješavanje diferencijalnih jednačbi uključuje sumiranje infinitezimalnih inkremenata preko svih vremenskih koraka  $dt$ . Kako bi izračunali doprinos  $(dW)^2$ , moramo sumirati  $(dW)^2$  preko svih vremenskih koraka za konačno vrijeme  $t$ . Kako bi ovo pokazali krenut ćemo od diskretnog opisa te onda otići u kontinuirani limit. Iz varijance za  $dW$  odmah možemo vidjeti da očekivana vrijednost od  $(dW)^2$  nije iščezavajuća

$$\text{Var}((dW)^2) = \langle (dW)^2 \rangle = dt. \quad (2.26)$$

Ako sumiramo po svim vremenskim koracima i odemo u infinitezimalni limit očekivana vrijednost integrala preko inkremenata  $(dW)^2$  je  $t$  (Jacobs, 2010).

$$\langle \int_0^t (dW)^2 \rangle = \int_0^t \langle (dW)^2 \rangle = \int_0^t ds = t. \quad (2.27)$$

Izračunajmo sada varijancu od  $\int_0^t (dW)^2$ . Budući da je  $\langle (\Delta W)^2 \rangle \sim \Delta t$  onda za varijancu od  $(\Delta W)^2$  mora vrijediti  $\text{Var}(\Delta W^2) \sim \Delta t^2 = t^2/N^2$ . Za varijancu od sume kvadratnih Wienerovih inkremenata vrijedi

$$\text{Var} \left[ \sum_{n=0}^{N-1} (\Delta W)^2 \right] = \sum_{n=0}^{N-1} \text{Var}[(\Delta W)^2] \sim \sum_{n=0}^{N-1} (\Delta t)^2 = t^2/N. \quad (2.28)$$

Ako sada uzmemo limes kad  $N \rightarrow \infty$  dobivamo da je varijanca sume kvadratnih Wienerovih inkremenata jednaka 0! Ovaj rezultat je jako iznenađujući budući da implicira da je integral kvadrata stohastičkih inkremenata zapravo deterministički.

$$\int_0^t (dW)^2 = \int_0^t ds = t. \quad (2.29)$$

Ovaj iznenađujući rezultat,  $(dW)^2 = dt$  zove se Ito lema. Upravo zbog ovoga, pri rješavanju stohastičkih diferencijalnih jednažbi moramo zadržati članove drugog reda u  $dW$ .

### 2.2.3 Bijeli šum

U prethodnim poglavljima stohastičke diferencijalne jednažbe pisali smo u formi  $dx = f(x, t)dt + g(x, t)dW$ , ali oblik ove jednažbe koji je češće korišten u fizici je sljedeći,  $\dot{x} = f(x, t) + g(x, t)\xi(t)$ , gdje je  $\xi(t)$  definiran kao  $\xi(t) \equiv dW(t)/dt$ . Ako razmislimo o ovom izrazu, on nam govori koliko se  $W(t)$  promijeni u infinitezimalnom vremenskom intervalu. No bez obzira koliko je vremenski interval mali,  $W(t)$  će se mijenjati nasumično u tom intervalu. Ukoliko odemo u krajnost,  $\xi(t)$  će biti razlomak kojem je u brojniku mali broj, a u nazivniku 0.

$$\frac{dW}{dt} = \lim_{\Delta t} \frac{W(t + \Delta t) - W(t)}{\Delta t} = \lim_{\Delta t} \frac{\Delta W}{\Delta t} \sim \lim_{\Delta t} \frac{1}{\sqrt{\Delta t}} = \infty \quad (2.30)$$

Ovdje smo uzeli u obzir da je, prema Ito lemi,  $\Delta W \sim \sqrt{\Delta t}$ . Iz jednažbe (2.30) vidimo da derivacija Wienerovog procesa ne postoji. Međutim, u određenom smislu postoji autokorelacija ove derivacije, a ta činjenica može biti korisna kao alat za izračun (Jacobs, 2010). Argumenta radi nazovimo derivaciju Wienerove funkcije  $\xi(t)$ . Budući da su inkrementi Wienerovog procesa u dva uzastopna vremenska intervala  $dt$  neovisni jedni o drugima,  $\xi(t)$  mora biti nekoreliran sam sa sobom kad god je razlika između vremenskih trenutaka veća od nule. Stoga moramo imati  $\langle \xi(t)\xi(t + \Delta t) \rangle = 0$  ako je  $\Delta t > 0$ . No ako izračunamo  $\langle \xi(t)\xi(t) \rangle$ , dobijemo,

$$\langle \xi(t)\xi(t) \rangle = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left\langle \frac{\Delta W}{\Delta t} \frac{\Delta W}{\Delta t} \right\rangle = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\langle \Delta W^2 \rangle}{\Delta t^2} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} = \infty. \quad (2.31)$$

Funkcija koja ima ovakva svojstva, da ima vrijednost 0 svugdje osim kad je  $t = t'$  gdje je  $t' = t + \Delta t$  je Dirakova delta funkcija,  $\delta(t - t')$ . Stoga generalno za autokorelaciju od  $\xi(t)$  vrijedi

$$\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = \delta(t - t'). \quad (2.32)$$

Ukoliko želimo ovo dokazati, trebamo se prisjetiti svojstava Wienerovog procesa: (1)  $W(t)$  ima Gaussovu distribuciju,  $W(t) \sim \mathcal{N}(0, \sqrt{dt})$ , (2)  $W(t)$  je Markovljev proces, odnosno  $W(t)$  je neovisan o svim prijašnjim vremenskim trenucima, (3) Inkrementi od  $W(t)$  su neovisni o trenutnoj vrijednosti  $W(t)$ , odnosno  $W(t + \Delta t) - W(t)$  je neovisno o  $W(t)$ . Direktno zbog svojstva (3) vrijedi  $\langle (W(t + \Delta t) - W(t)) \cdot W(t) \rangle = 0$ . Iz toga slijedi da je  $\langle W(t + \Delta t) \cdot W(t) \rangle = \langle W(t)^2 \rangle = t$ . Ovaj izraz možemo generalizirati na način

$$\langle W(t') \cdot W(t) \rangle = \min(t, t') \quad (2.33)$$

Gdje je  $\min(t, t')$  funkcija koja vraća manju vrijednost između  $t$  i  $t'$ . Ako sada idemo izračunati srednju vrijednost od  $\xi(t)$  dobijemo

$$\langle \xi(t) \rangle = \frac{d}{dt} \langle W(t) \rangle = 0. \quad (2.34)$$

Za autokorelaciju od  $\xi(t)$  sada možemo pokazati

$$\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = \frac{d}{dt} \frac{d}{dt'} \min(t, t') = \frac{d}{dt} \Theta(t' - t) = \delta(t - t'). \quad (2.35)$$

Ovdje smo uzeli u obzir da derivacija funkcije  $\min(t, t')$  daje Heaviside step funkciju  $\Theta(t' - t)$ , a derivacija od  $\Theta(t' - t)$  daje  $\delta(t - t')$ .

Funkciju  $\xi(t)$  zovemo Gaussov bijeli šum i upravo smo izveli glavna svojstva te funkcije:

- (1) Srednja vrijednost bijelog šuma iščezava,  $\langle \xi(t) \rangle = 0$ .
- (2) Autokorelacija bijelog šuma opisana je Diracovom delta funkcijom,  $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = \delta(t - t')$ .

## 2.2.4 Langevinova jednadžba

Uzmimo za primjer tijelo mase  $m$  koje je uronjeno u neki fluid, npr. vodu, i pretpostavimo da je masa tijela puno veća od mase molekula vode,  $m \gg m_w$ . Fluid će se opirati gibanju tijela s koeficijentom trenja  $\gamma$ . Molekule fluida predstavljaju rezervoar čestica na konačnoj temperaturi  $T$  što uzrokuje nasumično gibanje čestica fluida, ali također i nasumično sudaranje čestica fluida s tijelom koje će proizvesti fluktuacije u gibanju tijela koje promatramo. Na tijelo također može djelovati i neka vanjska sila  $\mathbf{F}$ . Jednadžbu gibanja ovog tijela dobijemo iz II Newtonovog zakona koji je prilagođen za stohastičke sustave tako da u sebi uključuje i nasumičnu silu  $L(t)$ ,

$$m\dot{v} = F - \gamma v + L(t). \quad (2.36)$$

Ova stohastička diferencijalna jednadžba zove se Langevinova jednadžba (van Kampen, 2007). Ona ima dva dijela, diskretni dio (prva dva člana s desne strane) koji uključuje vanjsku silu te gušenje sustava i stohastički dio (treći član s desne strane) koji uključuju mikroskopske fluktuacije.

Nasumična sila,  $L(t) = g\xi(t)$ , sastoji se od 2 dijela,  $g$  je konstanta koja karakterizira fluktuacije i koju tek trebamo odrediti i  $\xi(t)$  koji predstavlja Gaussov bijeli šum. Gaussov bijeli šum je ovdje dobra aproksimacija iz 2 glavna razloga: (1) Fluid se sastoji od mnogo čestica koje se zbog termalnih fluktuacija sudaraju s tijelom koje promatramo. Sile kojima pojedinačne

molekule djeluju na tijelo imaju neku raspodjelu, no prema centralno graničnom teoremu, u granici velikom broja čestica, imat ćemo Gaussovu raspodjelu, (2) Sudari čestica su trenutni i ne ovise o prethodnim sudarima stoga što je upravo svojstvo bijelog šuma,  $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = \delta(t - t')$ .

Da bi odredili konstantu  $g$  vratiti ćemo se na jednadžbu (2.36). Radi jednostavnosti stavit ćemo da je vanjska sila jednaka nuli ( $F = 0$ ) i da je masa jedinična ( $m = 1$ ) pri čemu ne gubimo na općenitosti. Jednadžba (2.36) poprima oblik:

$$\dot{v} = -\gamma v + g\xi(t). \quad (2.37)$$

Ova jednadžba opisuje, na primjer, gibanje čestice peluda u fluidu. Ona se može riješiti eksplicitno te njeno rješenje glasi:

$$v(t) = V_0 e^{-\gamma t} + g \int_0^t dt' e^{-\gamma(t-t')} \xi(t'). \quad (2.38)$$

Ako usrednjimo ovu jednadžbu te pretpostavimo da su sve Brownove čestice imale istu početnu brzinu  $V_0$  dobit ćemo srednju brzinu. Usrednjavanjem nam drugi član na desnoj strani iščezava zbog svojstva (2.34). Za srednju brzinu dobivamo:

$$\langle v(t) \rangle = V_0 e^{-\gamma t}. \quad (2.39)$$

Sada nas zanima kolika je srednja vrijednost kvadrata brzine. Da bi to dobili kvadrirat ćemo izraz (2.38):

$$\langle v(t)^2 \rangle = V_0^2 e^{-2\gamma t} + g^2 \int_0^t dt' \int_0^t dt'' e^{-\gamma(t-t')} e^{-\gamma(t-t'')} \langle \xi(t')\xi(t'') \rangle. \quad (2.40)$$

Nakon uvrštavanja svojstva (2.35) te rješavanja integrala dobivamo

$$\langle v(t)^2 \rangle = V_0^2 e^{-2\gamma t} + \frac{g^2}{2\gamma} (1 - e^{-2\gamma t}). \quad (2.41)$$

Ako pustimo da  $t \rightarrow \infty$  sustav će ući u stanje ravnoteže. Prema *ekviparticijskom teoremu*, u sustavu opisanom klasičnom mehanikom svi neovisni kvadratni članovi u energiji nose u toplinskoj ravnoteži jednaku srednju energiju,  $\frac{1}{2} k_B T$ . U našem slučaju imamo  $\langle v(\infty)^2 \rangle = k_B T$ . Uvrštavanjem dobivamo izraz:

$$\langle v(\infty)^2 \rangle = \frac{g^2}{2\gamma} = k_B T. \quad (2.42)$$

Iz ovog dobivamo da je  $g = \sqrt{2k_B T \gamma}$ . Ovaj izraz je važan jer nam karakterizira fluktuacije,  $g$ , koje su mikroskopsko svojstvo sustava te ih povezuje sa gušenjem,  $\gamma$ , koje je makroskopsko svojstvo. Dobili smo da je gušenje potpuno karakterizirano preko

mikroskopskih fluktuacija i temperature te je ovo reprezentativan primjer *fluktuacijsko disipacijskog* teorema.

S ovime, jednačba (2.36) poprima oblik

$$m\dot{v} = F - \gamma v + \sqrt{2k_B T \gamma} \xi(t). \quad (2.43)$$

Već smo spomenuli da je ovo Langevineova jednačba, no treba napomenuti da ova jednačba vrijedi u režimu slabog gušenja. Ovdje je gušenje definirano kao omjer inercijalnih i viskoznih sila, a taj broj zove se Reynoldsov broj. Kada inercijalne sile dominiraju nad viskoznim, Reynoldsov broj je velik i nalazimo se u režimu malog gušenja koji je dobro opisan jednačbom (2.36). No, u biološkim sustavima većinom dominiraju viskozne sile i posljedično mali Reynoldsov broj te taj režim nazivamo režim jakog gušenja. U tom slučaju, inercijalne sile su toliko slabe da inercijalni član u jednačbi (2.43) možemo zanemariti. Stoga, Langevinova jednačba u režimu jakog gušenja glasi,

$$\gamma v = F + \sqrt{2k_B T \gamma} \xi(t). \quad (2.44)$$

Budući da znamo jednačbe gibanja, možemo izračunati koliko iznosi varijanca, odnosno srednja vrijednost kvadrata položaja za Brownovu česticu. Opet ćemo krenuti od jednačbe (2.37):

$$\frac{d^2 x}{dt^2} = -\gamma \frac{dx}{dt} + L(t). \quad (2.45)$$

Množenjem jednačbe (2.45) s  $x$  dobijemo:

$$\frac{1}{2} \frac{d^2(x^2)}{dt^2} - v^2 = -\frac{\gamma}{2} \frac{d(x^2)}{dt} + L(t)x. \quad (2.46)$$

Ukoliko imamo veliki broj identičnih čestica, možemo usrednjiti gornju jednačbu koja vrijedi za pojedinačnu česticu te primijeniti ekviparticijski teorem. Srednja vrijednost  $\langle L(t)x \rangle$  iščezava te jednačba za  $\langle x^2 \rangle$  glasi:

$$\frac{1}{2} \frac{d^2 \langle x^2 \rangle}{dt^2} + \frac{\gamma}{2} \frac{d \langle x^2 \rangle}{dt} = k_B T. \quad (2.47)$$

Sada možemo naći rješenje te jednačbe:

$$\frac{d \langle x^2 \rangle}{dt} = \frac{2k_B T}{\gamma} + C e^{-\gamma t}, \quad (2.48)$$

gdje je  $C$  konstanta integracije. Drugi član s desne strane eksponencijalno trne u nulu stoga  $d \langle x^2 \rangle / dt$  brzo postiže konstantnu vrijednost. Ako još jednom integriramo gornju jednačbu (u asimptotskom režimu) dobivamo:



$$\langle x^2 \rangle - \langle x_0^2 \rangle = 2 \left( \frac{k_B T}{\gamma} \right) t, \quad (2.49)$$

gdje izraz u zagradama s desne strane upravo predstavlja difuzijsku konstantu,  $D = k_B T / \gamma$ .

$$D = \frac{k_B T}{\gamma}. \quad (2.50)$$

Ovaj izraz još se naziva *Einsteinova relacija*. Ona je također primjer fluktuacijsko disipacijskog teorema jer povezuje makroskopsko svojstvo sustava, difuziju  $D$ , s mikroskopskim fluktuacijama.

## 2.2.5 Fokker-Planckova jednadžba

Brownovo gibanje možemo također opisati jednadžbom kontinuiteta budući da imamo očuvan broj čestica u sustavu

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} + \frac{\partial J(x, t)}{\partial x} = 0. \quad (2.51)$$

Gdje je  $p(x, t)$  gustoća vjerojatnosti čestica, a  $J(x, t)$  je struja vjerojatnosti (van Kampen, 2007). Ukoliko na Brownovu česticu djeluje neka vanjska sila izraz za struju vjerojatnosti glasi

$$J(x, t) = \frac{F(x)}{\gamma} p(x, t) - D \frac{dp(x, t)}{dx}. \quad (2.52)$$

Prvi član dolazi od usmjerenog gibanja čestice zbog djelovanja vanjske sile dok drugi član opisuje difuziju čestica. Uvrštavanjem gornje jednadžbe u jednadžbu kontinuiteta dobivamo

$$\frac{\partial p}{\partial t} = - \frac{\partial}{\partial x} \left[ \frac{F(x)}{\gamma} p(x) - D \frac{\partial p}{\partial x} \right]. \quad (2.53)$$

Ova jednadžba opisuje vremensku evoluciju gustoće vjerojatnosti za česticu na koju djeluje vanjska sila te nasumične sile. Ona je poznata kao *Fokker-Planck* jednadžba, i nije specifična za Brownovo gibanje nego općenito vrijedi za neku stohastičku varijablu  $x(t)$ . Prvi član s desne strane zove se transportni član dok se drugi član naziva difuzijski član.

Ukoliko na česticu ne djeluje vanjska sila dobivamo difuzijsku jednadžbu

$$\frac{\partial p(x)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 p(x)}{\partial x^2}, \quad (2.54)$$

čije rješenje daje normalnu raspodjelu srednje vrijednosti 0 i varijance  $2Dt$ .

Usporedbom Langevinove i Fokker-Planck jednadžbe, možemo naći poveznicu između ova dva pristupa. U općenitom obliku, Langevineovu jednadžbu možemo napisati kao:

$$\frac{dx}{dt} = A(x) + B \xi(t). \quad (2.55)$$

Gdje je  $A(x)$  neka diferencijabilna funkcija dok je  $B$  u ovom slučaju konstanta. Odgovarajuća Fokker-Planck jednačba onda bi glasila:

$$\frac{dp}{dt} = -\frac{\partial}{\partial x} \left[ A(x)p(x) - \frac{B^2}{2} \frac{\partial p}{\partial x} \right]. \quad (2.56)$$

Na taj način smo dobili korespondenciju između stohastičke diferencijalne jednačbe koja opisuje promjenu neke varijable  $x(t)$  u vremenu i parcijalne diferencijalne jednačbe koja opisuje promjenu pridružene raspodjele vjerojatnosti  $p(x, t)$ .

Jednačbe (2.55) i (2.56) lako je generalizirati na slučaj više dimenzija. Promotrimo  $n$ -dimenzionalni sustav na koji djeluje  $m$  različitih (bijelih) šumova. Definirajmo koordinatu  $\mathbf{x}$  kao vektor  $\mathbf{x} = (x_1, \dots, x_n)$  i vektor šuma  $\boldsymbol{\xi} = (\xi_1, \dots, \xi_m)$ . Tada je Langevinova jednačba koja opisuje taj sustav:

$$\frac{d\mathbf{x}}{dt} = \mathbf{A}(\mathbf{x}) + [B] \boldsymbol{\xi}(t), \quad (2.57)$$

gdje je  $\mathbf{A}(\mathbf{x})$  sada  $n$ -dimenzionalni vektor, a  $[B]$  je  $m \times n$  matrica koja je za sada i dalje konstantna. Ekvivalentna Fokker-Planck jednačba glasi:

$$\frac{dp}{dt} = -\boldsymbol{\nabla} \cdot \left[ \mathbf{A}(\mathbf{x})p(\mathbf{x}, t) - \frac{1}{2} [B][B]^T \boldsymbol{\nabla} p \right], \quad (2.58)$$

gdje  $\boldsymbol{\nabla}$  označava derivaciju duž koordinata, odnosno  $\boldsymbol{\nabla} = \left( \frac{\partial}{\partial x_1}, \dots, \frac{\partial}{\partial x_n} \right)$ .

## 2.2.6 Ito i Stratonovich dilema

U jednačbi (2.36) nasumičnu silu  $L(t)$  množi konstanta, no općenito umjesto konstante možemo imati neku funkciju,  $B(x)$ . Langevinova jednačba sada glasi:

$$\dot{x} = A(x) + B(x)L(t). \quad (2.59)$$

Uvrštavanjem članova  $A(x)$  i  $B(x)$  u (2.56) dobivamo Fokker-Planck jednačbu:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{\partial}{\partial x} [A(x)p(x) + B(x)B'(x)p(x)] + \frac{B^2}{2} \frac{\partial^2 p}{\partial x^2}. \quad (2.60)$$

No, ako se sada iz ove Fokker-Planck jednačbe pokušamo vratiti u Langevineovu jednačbu dobit ćemo:

$$\dot{x} = A(x) + B(x)B'(x) + B(x)L(t). \quad (2.61)$$

Možemo primijetiti da smo dobili jedan član viška. Da bi dobili početnu jednačbu (2.59)  $B'(x)$  bi trebao iščezavati što je u kontradikciji s početnim pretpostavnom da je  $B$  funkcija od  $x$ .

Odnosno, jednađba (2.59) nije dobro definirana. Bez da se kaže kako se rješava stohastički integral, ona predstavlja besmislenu nakupinu simbola. Budući da za nasumičnu funkciju  $L(t)$  vrijedi (2.35) možemo ju vizualizirati kao slijed delta funkcija koje stižu u nasumičnim trenucima. Svaka delta funkcija u  $L(t)$  uzrokuje skok u  $x(t)$ . Stoga, vrijednost  $x$  u trenutku nailaska delta funkcije nije dobro definirana. Isto vrijedi i za  $B(x)$ . Iz jednađbe (2.59) nije jasno treba li vrijednost  $x$  uvrstiti u funkciju  $B(x)$  prije ili poslije nailaska delta funkcije ili možda treba uzeti srednju vrijednost. Ovisno o tome koju opciju izaberemo dobit ćemo različite Fokker-Planck jednađbe. Stratonovich je odlučio uzeti srednju vrijednost pri čemu imamo:

$$x(t + \Delta t) - x(t) = A(x(t))\Delta t + B\left(\frac{x(t + \Delta t) + x(t)}{2}\right) \int_t^{t+\Delta t} L(t')dt'. \quad (2.62)$$

Ako na ovaj način shvatimo jednađbu (2.59) dobit ćemo Fokker-Planck jednađbu oblika:

$$\frac{\partial p(v, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}(A(x) + B(x)B'(x))p + \frac{\partial^2}{\partial x^2}B(x)^2p. \quad (2.63)$$

Za razliku od Stratonovicha, Ito je uzео vrijednost  $x$  prije nailaska delta funkcije. On je jednađbu (2.59) shvatio na način:

$$x(t + \Delta t) - x(t) = A(x(t))\Delta t + B(x(t)) \int_t^{t+\Delta t} L(t')dt'. \quad (2.64)$$

Ovakvom interpretacijom dobijemo Fokker-Planck jednađbu oblika:

$$\frac{\partial p(v, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}A(x)p + \frac{\partial^2}{\partial x^2}B(x)^2p. \quad (2.65)$$

Ukoliko  $L(t)$  nije delta funkcija nego neka funkcija oštrog vrha s konačnim vremenom sudara ( $\tau_c > 0$ ) onda je (2.59) dobro definirana stohastička diferencijalna jednađba s dobro definiranom rješenjem. Ako uzmemo limes tog izraza kada  $\tau_c \rightarrow 0$  dobit ćemo rješenje Stratonovich forme Fokker-Planck jednađbe. Ito interpretacija ne može uopće biti formulirana ukoliko  $\tau_c$  nije striktno nula.

Drugačije interpretacije vode na drugačije članove s desne strane u jednađbama (2.63) i (2.65). Da bi riješili dilemu koju interpretaciju koristiti moramo razlikovati situacije u kojima je šum nametnut izvana od situacija u kojima šum potječe iz sustava. Vanjski šum odgovara fluktuacijama u inače determinističkom sustavu zbog utjecaja neke nasumične sile. U tom slučaju jednađba (2.59) je dobro definirana ukoliko  $A(x)$  odgovara determinističkom gibanju izoliranog sustava, dok  $L(t)$  aproksimiramo bijelim šumom. Stoga, za vanjski šum vrijedi Stratonovich interpretacija te ćemo za takav sustav imati Fokker-Planck jednađbu oblika (2.63). Intrinzični šum uzrokovan je činjenicom da se sustav sastoji od diskretnim česticama, taj šum dolazi iz samog mehanizma kojim se sustav razvija. Budući da njega ne možemo isključiti, nemoguće je definirati  $A(x)$  kao jednađbu razvoja izoliranog sustava.

U literaturi se obično za jednadžbu napisanu kao (2.59) pretpostavlja Ito interpretacija. Ako se radi o Stratonovich interpretaciji, jednadžbu (2.59) treba zapisati kao:

$$\dot{x} = A(x) + B(x) \circ L(t). \quad (2.66)$$

Ovdje znak ' $\circ$ ' označava Stratonovich interpretaciju (van Kampen, 2007). Iako za Langevinove jednadžbe s konstantnim šumom nema smisla navoditi interpretaciju, treba biti na oprezu kad se na takvim jednadžbama rade algebarske operacije (npr. promjena koordinatnog sustava, računanje funkcije udaljenosti itd.). Ukoliko se za rezultat dobije nova jednadžba u kojoj matrica šumova više nije konstantna, takva jednadžba se mora shvatiti u Stratonovich interpretaciji! Prednost Stratonovich interpretacije je da se u njoj mogu raditi sve algebarske operacije na isti način kao što bi se radile na običnoj diferencijalnoj jednadžbi. Da bi se dobila Ito interpretacija stohastičke diferencijalne jednadžbe oblika  $\dot{x} = \mathbf{A}(\mathbf{x}) + [\mathbf{B}(\mathbf{x})] \circ \boldsymbol{\eta}(t)$ , potrebno je s desne strane dodati još jedan deterministički član, engl. *spurious drift*. Njega dobivamo tako da prvo šum zapišemo kao  $\sum_{i=1}^m \mathbf{V}_i(\mathbf{x})\eta_i$ , gdje su  $\mathbf{V}_i$  vektor stupci matrice  $[\mathbf{B}]$ . Zatim se dodatni član računa kao:

$$\bar{\mathbf{A}}(\mathbf{x}) = (1/2) \sum_{i=1}^m \nabla_{\mathbf{V}_i} \mathbf{V}_i(\mathbf{x}), \quad (2.67)$$

gdje  $\nabla_{\mathbf{V}_i}$  označava usmjerenu derivaciju duž vektora  $\mathbf{V}_i$ . Ta jednadžba u Ito interpretaciji tada glasi  $\dot{x} = \mathbf{A}(\mathbf{x}) + \bar{\mathbf{A}}(\mathbf{x}) + [\mathbf{B}(\mathbf{x})]\boldsymbol{\eta}(t)$ .

## 2.3 Kinetička jednadžba

Razmotrimo zatvoreni volumen  $\Omega$  koji sadrži mješavinu kemijskih spojeva  $X_j (j = 1, 2, \dots, J)$ . Neka  $n_j$  označava broj molekula  $X_j$ , a  $c_j = n_j/\Omega$  koncentraciju. Uzmimo najjednostavniji slučaj, u kojem pretpostavljamo da je koncentracija izotropna i ovisi samo o vremenu,  $c_i(t)$ . Također uvodimo oznaku  $\{c_j\}$  kao skraćenicu za skup  $(c_1, c_2, c_3, \dots, c_J)$  gdje se svaki indeks odnosi na drugu vrstu molekula (van Kampen, 2007). Temeljni postulat paradigme kinetičke jednadžbe je da vremensku evoluciju koncentracije možemo napisati u obliku diferencijalne jednadžbe kao

$$\frac{dc_i(t)}{dt} = f(\{c_j\}; \{k_i\}). \quad (2.68)$$

Ove različite koncentracije  $c_1, c_2, \dots, c_J$  su za sve vrste molekula uključene u reakcije od interesa, a parametri  $k_i$  su stope koje određuju koliko se brzo odvijaju razne reakcije. Jednadžba (2.68) opisuje kako se koncentracija  $i$ -te vrste mijenja u vremenu. Kinetička jednadžba izražena

preko koncentracija najčešće se koristi u kontekstu kemijskih reakcija, no možemo ju također izraziti preko broja molekula ili distribucije vjerojatnosti ovisno o tome koji problem rješavamo.

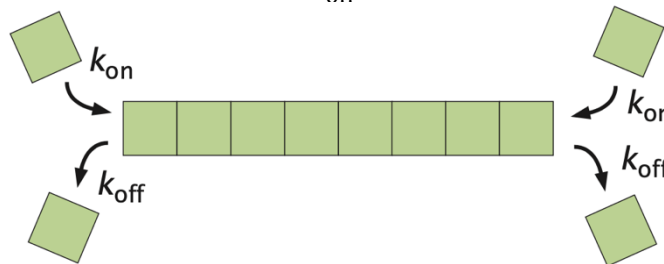
Ovdje ćemo se poslužiti primjerom polimerizacije i depolimerizacije mikrotubula. Zamislimo mikrotubul kao  $n$ -mer koji može mijenjati svoju duljinu dodavanjem ili gubitkom jednom monomera, **slika 2.3**. Vjerojatnost da u trenutnu  $t$  imamo mikrotubul duljine  $n$  označavamo kao  $P_n(t)$ . Kinetička jednačba koja bilježi promjenu u broju  $n$ -mera može se simbolički zapisati kao

$$\frac{dP_n(t)}{dt} = \text{stopa dodavanja monomera} - \text{stopa gubitka monomera}. \quad (2.69)$$

Reakcija koju razmatramo je



Ova reakcija govori da se monomer može vezati na  $n$ -mer stopom  $k_{\text{on}}$  te tako proizvesti  $(n + 1)$ -mer. No isto tako,  $(n + 1)$ -mer može izgubiti jedan monomer stopom  $k_{\text{off}}$ . Naš cilj je napisati kinetičku jednačbu za ovaj proces, odnosno vremensku evoluciju od  $P_n$ . No, primijetimo da evolucija od  $P_n$  ovisi o također o evoluciji  $P_{n-1}$  i  $P_{n+1}$ . Stoga, moramo također uzeti u obzir sljedeću reakciju



**Slika 2.3:** *Ilustracija jednostavnog modela za polimerizaciju i depolimerizaciju mikrotubula. Modificirano iz (Phillips et al., 2013).*

Sada možemo napisati jednačbu vremenske evolucije za  $P_n$

$$\frac{dP_n}{dt} = k_{\text{on}}P_{n-1}P_1 + k_{\text{off}}P_{n+1} - k_{\text{on}}P_nP_1 - k_{\text{off}}P_n. \quad (2.72)$$

Svaki član s desne strane jednačbe predstavlja jedan od smjerova u reakcijama (2.70) i (2.71). Prva dva člana povećavaju vjerojatnost za nalaženje mikrotubula duljine  $n$ , na način da se filamentu duljine  $n - 1$  podjedinica doda jedan monomer ili da filament duljine  $n + 1$  izgubi

jedan monomer. S druge strane, zadnja dva člana smanjuju tu vjerojatnost opisujući procese kojima se na filament duljine  $n$  veže još jedan monomer ili filament duljine  $n$  gubi jedan monomer pa tako ostaje sa  $n - 1$  podjedinica. Jedna od zanimljivih stvari koju možemo izračunati koristeći kinetičku jednadžbu je primjerice prosječna duljina filameta kao funkciju vremena (Phillips et al., 2013).

## 3 Teorijski opis evolucije kariotipa

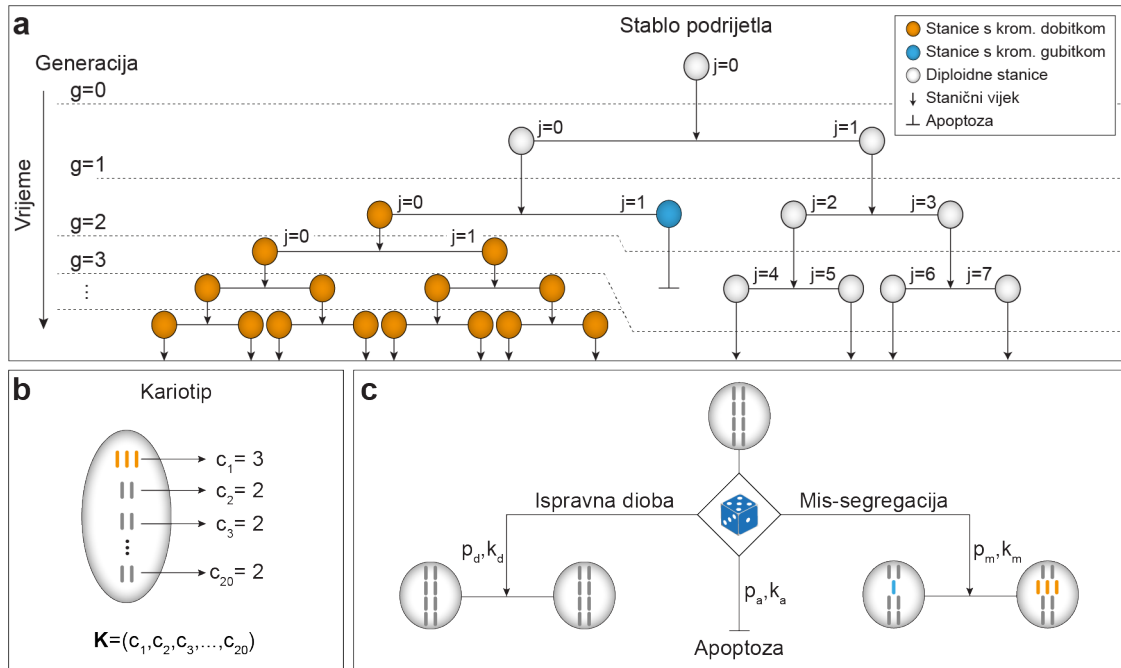
Teorijski pristup u istraživanju evolucije tumorskih kariotipa postavlja dva glavna izazova: veliki broj kombinacija kariotipa i veliki broj stanica koji tumorska tkiva mogu sadržavati. Kako bismo doskočili tim problemima, osmislili smo novi pristup temeljen na konceptu makrokariotipa. Makrokariotip definiramo kao kariotip koji sadrži broj kopija specifičnih kromosoma koji su ključni za proces od interesa, dok se za druge kromosome računaju samo ukupni dobici i gubici kromosoma. Makrokariotip sadrži sve relevantne informacije o točnom kariotipu stanice, dok značajno smanjuje broj kombinacija kariotipa te omogućuje korištenje izračuna srednjeg polja, pomoću kojega se mogu opisati velike populacije stanica. Dakle, snaga ovog pristupa leži u tome što nam omogućuje praćenje evolucije kariotipa za gotovo neograničen broj stanica i generacija.

### 3.1 „Makrokariotip“ model

#### 3.1.1 Definicija kariotipa i stablo podrijetla

U našem modelu, računamo evoluciju kariotipa i pripadajuće stablo podrijetla (**slika 3.1a**). Kariotip stanice s  $n$  različitih kromosoma opisano je vektorom,  $\mathbf{K} \equiv (c_1, \dots, c_n)$ , gdje  $c_i$  označava broj kopija  $i$ -og kromosoma (**slika 3.1b**). Zbog učestalog korištenja, uvodimo notaciju za neke kariotipe. Diploidni kariotip označavamo vektorom  $\mathbf{K}_{2n} \equiv (c_1 = 2, \dots, c_n = 2)$ . Zatim, kariotipi s barem jednim kromosomom manjka čine set kariotipa  $K_- = \{(c_1, \dots, c_n) \mid \exists c_i = 1, i = 1, \dots, n\}$  dok kariotipi s barem jednim kromosomom viška čine set  $K_+ = \{(c_1, \dots, c_n) \mid \exists c_i \geq 3, i = 1, \dots, n\}$ . Također uvodimo notaciju za set kariotipa koji imaju višak kromosoma 15,  $K_{+15} = \{(c_1, \dots, c_n) \mid c_{15} \geq 3\}$  i set kariotipa koji imaju višak kromosoma 14 i 15,  $K_{+14,+15} = \{(c_1, \dots, c_n) \mid c_{14} \geq 3, c_{15} \geq 3\}$ . Kariotipi koji istovremeno imaju višak i manjak nekih kromosoma pripadaju više setova.

Pomoću stabla podrijetla možemo pratiti više generacija stanica, počevši od stanice u generaciji  $g = 0$  (**slika 3.1a**). U generaciji  $g$  broj stanica može biti maksimalno  $2^g$ , gdje svaka stanica ima jedinstveni index  $j = 0, \dots, 2^g - 1$ . Budući da stanice mogu otići u programiranu staničnu smrt i tako „nestati“ iz populacije, pripadajući indeks  $j$  će izostati te će ukupan broj stanica u toj generaciji biti manji od  $2^g$ .



**Slika 3.1:** *a*, Ilustracija stabla podrijetla u kojem je prikazano nekoliko generacija stanica, počevši od diploidne stanice (sivi krug) u generaciji,  $g = 0$ . Ukoliko dođe do missegregacije, stanice kćeri će imati višak (narančasti krugovi) ili manjak (plavi krugovi) kromosoma. Strelice prema dolje naznačuju stanični vijek  $i$  u ovoj shemi možemo primijetiti da stanice s viškom kromosoma imaju kraći vijek od diploidnih stanica. *b*, Definicija kariotipa. *c*, Mogući ishodi stanične diobe.

Životni vijek stanice,  $t_0$ , ovisi o njezinom kariotipu i završava staničnom diobom ili apoptozom, s pripadajućim vjerojatnostima  $1 - p_a$  i  $p_a$ . Tijekom stanične diobe kromosomi se mogu podijeliti ispravno, tako da svaka polovica dupliciranog kromosoma (kromatida) ode u jednu od dvije stanice kćeri, ili se mogu missegregirati tako da obje kromatide završe u istoj stanici kćeri. Spomenuti ishodi ovise o kariotipu stanice te se događaju s pripadajućim vjerojatnostima,  $p_d$  i  $p_m$  (**slika 3.1c**). U našem modelu, missegregacija više kromosoma je neovisan događaj i vjerojatnost missegregacije po stanici računa se kao  $p_m = \sum_{i=1}^n p_{m_i}$ . Ovaj aproksimativni izraz vrijedi kada je missegregacija rijedak događaj,  $p_m \ll 1$ . Vjerojatnost missegregacije za  $i$ -ti kromosom,  $p_{m_i}$ , računa se iz umnoška broja kopija tog kromosoma i vjerojatnost missegregacije jednog kromosoma,  $p_0$ ,  $p_{m_i} = p_0 c_i$ . Ove vjerojatnosti, zajedno sa životnim vijekom stanice i njenom pozicijom u stablu podrijetla, definiraju stohastički model za evoluciju kariotipa.



### 3.1.2 Vremenska evolucija za populaciju stanica

Dok stohastički model može pratiti svaku pojedinu stanicu, njegova glavna mana je nemogućnost praćenja svih stanica tijekom velikog broj generacija. Kako bismo doskočili ovom problemu, razvijamo pristup srednjeg polja koji nam omogućuje da počnemo s velikim brojem stanica i slijedimo ih tijekom mnogo generacija. Prvo računamo vjerojatnost da se stanica s kariotipom  $\mathbf{K}$  nalazi na poziciji  $j$  u stablu podrijetla,  $P_{g,j}(\mathbf{K})$ , uzimajući u obzir da se stanice u generaciji  $g$  pojave kao rezultat dijeljenja stanica u prethodnoj generaciji,  $g - 1$ , dok stanice u generaciji  $g$  nestaju prilikom njihove diobe ili apoptoze. Vremensku evoluciju ovih vjerojatnosti računamo iz sljedeće jednadžbe:

$$\begin{aligned} \frac{dP_{g,j}(\mathbf{K})}{dt} = & k_d(\mathbf{K})P_{g-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K}) + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i)P_{g-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i) \\ & + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i)P_{g-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i) - [k_d(\mathbf{K}) + k_m(\mathbf{K}) + k_a(\mathbf{K})]P_{g,j}(\mathbf{K}). \end{aligned} \quad (3.1)$$

Prvi član na desnoj strani opisuje ispravnu diobu stanice u generaciji  $g - 1$  s kariotipom  $\mathbf{K}$ , koju nazivamo stanica majka, nakon čega nastanu dvije stanice kćeri s istim kariotipom u generaciji  $g$ . Drugi i treći član opisuju slučajeve kada se stanice majke s kariotipima  $\mathbf{K} \pm \mathbf{e}_i$  missegregiraju na način da dobiju ili izgube  $i$ -ti kromosom prilikom čega nastanu stanice kćeri od kojih jedna ima kariotip  $\mathbf{K}$ . Zadnji član opisuje podjelu ili apoptozu stanica kćeri i pojavljuju se s negativnim predznakom budući da oba događaja smanjuju vjerojatnost da se stanica s kariotipom  $\mathbf{K}$  i sa staničnim indeksom  $j$  nalazi u generaciji  $g$ . Jedinični vektor  $\mathbf{e}_i$  ima vrijednost 1 na  $i$ -toj koordinati a 0 inače.

Indeksi u jednadžbi (3.1) označavaju poziciju stanice u stablu podrijetla koja je određena generacijom  $g$  i staničnim indeksom  $j$ . Prema tome, stanica kćer koja pripada generaciji  $g$  i ima stanični indeks  $j$  nastaje od stanice majke iz generacije  $g - 1$  koja ima stanični indeks  $\lfloor j/2 \rfloor$  (**slika 3.1a**). Funkcija pod ili najveće cijelo  $\lfloor \cdot \rfloor$  osigurava da dvije stanice kćeri, jedna sa parnim i druga s neparnim indeksom  $j$ , odgovaraju jednoj stanici majki. U slučaju missegregacije, svaka stanica kćer ima jednaku vjerojatnost da dobije ili izgubi jedan kromosom no samo jedna od njih, ona sa kariotipom  $\mathbf{K}$ , doprinosi jednadžbi (3.1) i zato te članove množimo s  $1/2$ .

Stope u jednadžbi (3.1) opisuju ispravnu staničnu diobu,  $k_d(\mathbf{K})$ , apoptozu,  $k_a(\mathbf{K})$  i missegregaciju kromosoma,  $k_m(\mathbf{K}) = \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K})$  gdje  $k_{m_i}(\mathbf{K})$  označava stopu missegregacije  $i$ -tog kromosoma (**slika 3.1c**). Stope apoptoze i missegregacije  $i$ -tog

kromosoma računaju se kao  $k_{a,m_i} = \beta p_{a,m_i} / \ln 4$ , gdje se stopa kojom se stanica prolifera i vrijeme život stanice odnose kao  $\beta = \ln 2 / t_0$ . Korekcijski faktor  $\ln 4$  dolazi zbog toga što je stanična dioba u jednadžbi (3.1) Poissonov proces, gdje svaka stanica ima jednaku vjerojatnost da se podijeli neovisno o starosti stanice, dok je više realno da sve stanice žive jednako dugo (pogledaj Dodatak). Stopa ispravne diobe implicitno je zadana izrazom  $\beta = k_d + k_m + k_a$ .

### 3.1.3 Jednadžba stope za broj stanica s određenim kariotipom

Za bolje razumijevanje evolucije kariotipa, važno je izračunati broj stanica s određenim kariotipom tijekom vremena, neovisno o poziciji u stablu podrijetla. Stoga, definiramo broj stanica s određenim kariotipom kao  $N(\mathbf{K}) \equiv \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2^g-1} P_{g,j}(\mathbf{K})$  i računamo njegovu vremensku evoluciju tako da sumiramo jednadžbu (3.1) preko indexa  $g$  i  $j$ ,

$$\begin{aligned}
& \frac{d}{dt} \left( \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2^g-1} P_{g,j}(\mathbf{K}) \right) \\
&= k_d(\mathbf{K}) \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2^g-1} P_{g-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K}) \\
&+ \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i) \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2^g-1} P_{g-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i) \\
&+ \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i) \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2^g-1} P_{g-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i) \\
&- [k_d(\mathbf{K}) + k_m(\mathbf{K}) + k_a(\mathbf{K})] \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2^g-1} P_{g,j}(\mathbf{K}).
\end{aligned} \tag{3.2}$$

U članu s lijeve strane jednadžbe kao i u zadnjem članu s desne strane jednadžbe lako je prepoznati definiciju za broj stanica  $N(\mathbf{K})$ . Za računanje izraza  $\sum_{g=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2^g-1} P_{g-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i)$  prvo radimo supstituciju  $f = g - 1$ ,

$$\sum_{g=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2^g-1} P_{g-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K}) = \sum_{f=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{2 \cdot 2^f-1} P_{f, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K}). \tag{3.3}$$

Uočite da suma počinje s vrijednosti  $f = 0$  budući da negativne generacije ne postoje,  $P_{-1, \lfloor \frac{j}{2} \rfloor}(\mathbf{K}) = 0$ . Funkcija pod ili najveće cijelo,  $\lfloor \frac{j}{2} \rfloor$ , ima istu vrijednost za dvije vrijednosti

indeksa  $j$  i zbog toga sumu po indeksu  $j$  dijelimo na dvije sume, jednu za  $j = 2a$  i drugu za  $j = 2b + 1$ . Opet možemo prepoznati definiciju za broj stanica i dobivamo,

$$\sum_{f=0}^{\infty} \sum_{a=0}^{2^f-1} P_{f,a}(\mathbf{K}) + \sum_{f=0}^{\infty} \sum_{b=0}^{2^f-1} P_{f,b}(\mathbf{K}) = 2N(\mathbf{K}). \quad (3.4)$$

Sada jednačba (3.1) poprima oblik,

$$\begin{aligned} \frac{dN(\mathbf{K})}{dt} = & k_d(\mathbf{K}) \cdot 2N(\mathbf{K}) + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i) \cdot 2N(\mathbf{K}) \\ & + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i) \cdot 2N(\mathbf{K}) - [k_d(\mathbf{K}) + k_m(\mathbf{K}) + k_a(\mathbf{K})]N(\mathbf{K}). \end{aligned} \quad (3.5)$$

Nakon preraspodjele članova dobivamo konačni oblik jednačbe za evoluciju broja stanica s određenim kariotipom u vremenu,

$$\begin{aligned} \frac{dN(\mathbf{K})}{dt} = & [k_d(\mathbf{K}) - k_m(\mathbf{K}) - k_a(\mathbf{K})]N(\mathbf{K}) + \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i)N(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i) \\ & + \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i)N(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i). \end{aligned} \quad (3.6)$$

Dimenzionalnost ove jednačbe je  $2^{g+1} - 1$  puta manja od dimenzionalnosti jednačbe (3.1), a u njoj je zadržana potpuna informacija o kariotipovima stanica u populaciji.

### 3.1.4 Definicija makrokariotipa i redukcija dimenzionalnosti

Unatoč smanjenoj dimenzionalnosti, jednačbu (3.2) ne možemo riješiti direktnom integracijom na superračunalu zbog velikog broja kombinacija kariotipa. Iz tog razloga, rješavamo jednačbu (3.2) na način da reduciramo prostor vektora  $\mathbf{K}$  i istovremeno zadržimo sve bitne informacije o kariotipu, primjerice je li kariotip euploidan ili aneuploidan i ukoliko aneuploidni kariotip sadrži monosomije ili trisomije. Stoga, konstruiramo vektor koji sadrži sve spomenute informacije o kariotipu,  $\mathbf{M}(\mathbf{K}) \equiv (x_1, \dots, x_L)$  i nazivamo ga makrokariotip. Ovdje komponenta  $x_l(\mathbf{K}) \equiv \sum_{i=1}^n \delta_{l,c_i}$  označava broj kromosoma s  $l$  kopija, a index  $L$  označava maksimalni broj kopija koje kromosom može imati. Budući da nuliosomije nisu opisane u našem modelu, broj različitih kromosoma po stanici je očuvan,  $x_1 + \dots + x_L = n$ . Dakle, makrokariotip definiran na ovaj način uključuje više kariotipa. Određeni makrokariotip dobiva

se kao skup permutacija vektorskih komponenti za svaki kromosom  $c_i$  i broj stanica s tim makrokariotipom računa se na način  $\tilde{N}(\mathbf{M}) = (x_1! \cdots x_L!)^{-1} \times \sum_{\text{all perm.}} N(\mathbf{K})$ . Ovdje je normalizacija korekcija za višestruko brojanje istog kariotipa.

Da bismo izračunali kako se broj stanica s određenim makrokariotipom mijenja u vremenu, sumiramo jednadžbu (3.2) po svim kromosomskim permutacijama,

$$\begin{aligned} \frac{1}{x_1! \cdots x_L!} \sum_{\text{all perm.}} \frac{d}{dt} N(\mathbf{K}) \\ = \frac{1}{x_1! \cdots x_L!} \sum_{\text{all perm.}} \left\{ [k_d(\mathbf{K}) - k_m(\mathbf{K}) - k_a(\mathbf{K})] N(\mathbf{K}) \right. \\ \left. + \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i) N(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i) + \sum_{i=1}^n k_{m_i}(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i) N(\mathbf{K} - \mathbf{e}_i) \right\}. \end{aligned} \quad (3.7)$$

Ovdje operator  $\sum_{\text{all perm.}}$  označava sumaciju preko svih permutacija broja kromosomskih kopija  $c_1, \dots, c_n$  za dani kariotip  $\mathbf{K}$ , dok u slučaju složenog kariotipa, kao primjerice  $\mathbf{K} + \mathbf{e}_i = (c_1, \dots, c_i + 1, \dots, c_n)$ , označava sumaciju preko svih permutacija tog složenog kariotipa.

Jednadžba (3.7) se dramatično pojednostavi u slučaju kada stope  $k_{d,m,a}(\mathbf{K})$  imaju istu vrijednost za sve permutacije komponenti vektora  $\mathbf{K}$ , odnosno kada te stope imaju jednu vrijednost za isti makrokariotip. Ovo ograničenje implementiramo tako da uvedemo stope koje su funkcije makrokariotipa i imaju istu vrijednost kao stope za odgovarajuće kariotipe koji pripadaju tom makrokariotipu,  $\tilde{k}_{d,m,a}(\mathbf{M}) = k_{d,m,a}(\mathbf{K})$ , gdje je  $\mathbf{M} = \mathbf{M}(\mathbf{K})$ . U tom slučaju, članovi na desnoj strani jednadžbe se pojednostavljaju na  $(x_1! \cdots x_L!)^{-1} \sum_{\text{all perm.}} k_{d,m,a}(\mathbf{K}) N(\mathbf{K}) = \tilde{k}_{d,m,a}(\mathbf{M}) \tilde{N}(\mathbf{M})$ . Stopa missegregacije za dani kariotip glasi  $k_m(\mathbf{K}) = (\ln 4)^{-1} p_0 \beta \sum_{i=1}^n c_i$ . Za odgovarajući makrokariotip ta stopa poprima oblik  $\tilde{k}_m(\mathbf{M}) = (\ln 4)^{-1} p_0 \beta \sum_{l=1}^L l x_l$ . Suma u ovim stopama označava ukupan broj kromosoma,  $\sum_{i=1}^n c_i = \sum_{l=1}^L l x_l$ .

U slučaju složenog kariotipa  $\mathbf{K} + \mathbf{e}_i$  koji se pojavljuje u drugom članu na desnoj strani jednadžbe (3.7), broj stanica pripadajućeg makrokariotipa glasi  $\tilde{N}(x_1, \dots, x_{c_i} - 1, x_{c_i+1} + 1, \dots, x_L) = (x_1! \cdots (x_{c_i} - 1)! (x_{c_i+1} + 1)! \cdots x_L!)^{-1} \sum_{\text{all perm.}} N(\mathbf{K} + \mathbf{e}_i)$ . Analogno vrijedi za složeni kariotip  $\mathbf{K} - \mathbf{e}_i$  u trećem članu. S ovime, jednadžba (3.7) poprima oblik

$$\begin{aligned}
\frac{d\tilde{N}(x_1, \dots, x_L)}{dt} &= [\tilde{k}_d(x_1, \dots, x_L) - \tilde{k}_m(x_1, \dots, x_L) - \tilde{k}_a(x_1, \dots, x_L)]\tilde{N}(x_1, \dots, x_L) \\
&+ \frac{p_0}{\ln 4} \sum_{i=1}^n (c_i + 1) \frac{x_{c_i+1} + 1}{x_{c_i}} \beta(x_1, \dots, x_{c_i} - 1, x_{c_i+1} + 1, \dots, x_L) \\
&\cdot \tilde{N}(x_1, \dots, x_{c_i} - 1, x_{c_i+1} + 1, \dots, x_L) \\
&+ \frac{p_0}{\ln 4} \sum_{i=1}^n (c_i - 1) \frac{x_{c_i-1} + 1}{x_{c_i}} \beta(x_1, \dots, x_{c_i-1} + 1, x_{c_i} - 1, \dots, x_L) \\
&\cdot \tilde{N}(x_1, \dots, x_{c_i-1} + 1, x_{c_i} - 1, \dots, x_L).
\end{aligned} \tag{3.8}$$

Ovdje smo koristili definiciju  $k_{m_i}(\mathbf{K} \pm \mathbf{e}_i) = (\ln 4)^{-1} p_0 (c_i \pm 1) \beta(\mathbf{K} \pm \mathbf{e}_i)$ . Kako bismo grupirali elemente s obzirom na broj kopija kromosoma, koristimo identitet  $\sum_{l'=1}^L \delta_{l', c_i} = 1$ , kao i definiciju  $x_{l'} = \sum_{i=1}^n \delta_{l', c_i}$ . Jednadžba (3.8) sada glasi

$$\begin{aligned}
\frac{d\tilde{N}(\mathbf{M})}{dt} &= [\tilde{k}_d(\mathbf{M}) - \tilde{k}_m(\mathbf{M}) - \tilde{k}_a(\mathbf{M})]\tilde{N}(\mathbf{M}) \\
&+ \frac{p_0}{\ln 4} \sum_{l'=1}^{L-1} (l' + 1)(x_{l'+1} + 1) \beta(\mathbf{M} - \boldsymbol{\epsilon}_{l'} + \boldsymbol{\epsilon}_{l'+1}) \\
&\cdot \tilde{N}(\mathbf{M} - \boldsymbol{\epsilon}_{l'} + \boldsymbol{\epsilon}_{l'+1}) \\
&+ \frac{p_0}{\ln 4} \sum_{l'=2}^L (l' - 1)(x_{l'-1} + 1) \beta(\mathbf{M} + \boldsymbol{\epsilon}_{l'-1} - \boldsymbol{\epsilon}_{l'}) \\
&\cdot \tilde{N}(\mathbf{M} + \boldsymbol{\epsilon}_{l'-1} - \boldsymbol{\epsilon}_{l'}).
\end{aligned} \tag{3.9}$$

U gornjoj jednadžbi složeni makrokariotip je zapisan pomoću jediničnog vektora  $\boldsymbol{\epsilon}_{l'}$  koji ima vrijednost 1 na koordinati  $l'$ a inače ima vrijednost 0. Gornja granica sumacije u drugom članu je  $L - 1$  kako bi izbjegli broj kopija veći od maksimalnog broja kopija  $L$ , dok je donja granica sumacije u trećem članu 2 jer stanice s 0 kopija nekog kromosoma ne mogu preživjeti. Na kraju, radimo supstituciju  $l = l' + 1$  za drugi član i  $l = l' - 1$  za treći član i s ovim dobivamo,

$$\begin{aligned}
\frac{d\tilde{N}(\mathbf{M})}{dt} &= [\tilde{k}_d(\mathbf{M}) - \tilde{k}_m(\mathbf{M}) - \tilde{k}_a(\mathbf{M})]\tilde{N}(\mathbf{M}) \\
&+ \frac{p_0}{\ln 4} \sum_{l=2}^L l(x_l + 1) \beta(\mathbf{M} - \boldsymbol{\epsilon}_{l-1} + \boldsymbol{\epsilon}_l) \tilde{N}(\mathbf{M} - \boldsymbol{\epsilon}_{l-1} + \boldsymbol{\epsilon}_l) \\
&+ \frac{p_0}{\ln 4} \sum_{l=1}^{L-1} l(x_l + 1) \beta(\mathbf{M} + \boldsymbol{\epsilon}_l - \boldsymbol{\epsilon}_{l+1}) \tilde{N}(\mathbf{M} + \boldsymbol{\epsilon}_l - \boldsymbol{\epsilon}_{l+1}).
\end{aligned} \tag{3.10}$$

Ako nadalje prepoznamo definicije za stope missegregacije  $\tilde{k}_{m_l}(\mathbf{M} - \boldsymbol{\epsilon}_{l-1} + \boldsymbol{\epsilon}_l) = \frac{p_0}{\ln 4} l(x_l + 1) \beta(\mathbf{M} - \boldsymbol{\epsilon}_{l-1} + \boldsymbol{\epsilon}_l)$  i  $\tilde{k}_{m_l}(\mathbf{M} + \boldsymbol{\epsilon}_l - \boldsymbol{\epsilon}_{l+1}) = \frac{p_0}{\ln 4} l(x_l + 1) \beta(\mathbf{M} + \boldsymbol{\epsilon}_l - \boldsymbol{\epsilon}_{l+1})$  u drugom i

trećem članu dobivamo konačnu formu jednadžbe za evoluciju broja stanica s određenim makrokariotipom,

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{N}(\mathbf{M})}{dt} = & [\tilde{k}_d(\mathbf{M}) - \tilde{k}_m(\mathbf{M}) - \tilde{k}_a(\mathbf{M})]\tilde{N}(\mathbf{M}) \\ & + \sum_{l=2}^L \tilde{k}_{m_l}(\mathbf{M} - \epsilon_{l-1} + \epsilon_l)\tilde{N}(\mathbf{M} - \epsilon_{l-1} + \epsilon_l) \\ & + \sum_{l=1}^{L-1} \tilde{k}_{m_l}(\mathbf{M} + \epsilon_l - \epsilon_{l+1})\tilde{N}(\mathbf{M} + \epsilon_l - \epsilon_{l+1}). \end{aligned} \quad (3.11)$$

Jedinični vektori  $\epsilon_l$ ,  $\epsilon_{l+1}$  i  $\epsilon_{l-1}$  imaju vrijednost 1 na pripadajućim koordinatama  $l$ ,  $l + 1$  i  $l - 1$ , a 0 inače. Za proučavanje kariotipa sa specifičnim kromosomima, generaliziramo pristup na način da konstruiramo prošireni makrokariotip  $\mathbf{M}_{\text{ext}}(\mathbf{K}) \equiv (x_1, \dots, x_L, c_{15})$ , gdje zadnja komponenta uzima u obzir broj kopija specifičnog kromosoma, u ovom slučaju, kromosoma 15 te jednadžba za evoluciju proširenog makrokariotipa glasi,

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{N}_{\text{ext}}(x_1, \dots, x_L, c_{15})}{dt} = & [\tilde{k}_d(x_1, \dots, x_L, c_{15}) - \tilde{k}_m(x_1, \dots, x_L, c_{15}) \\ & - \tilde{k}_a(x_1, \dots, x_L, c_{15})]\tilde{N}_{\text{ext}}(x_1, \dots, x_L, c_{15}) \\ & + \sum_{l=2}^L k_{m_l}(x_1, \dots, x_{l-1} - 1, x_l + 1, \dots, x_L, c_{15})\tilde{N}_{\text{ext}}(x_1, \dots, x_{l-1} \\ & - 1, x_l + 1, \dots, x_L, c_{15}) \\ & + \sum_{l=1}^{L-1} k_{m_l}(x_1, \dots, x_l + 1, x_{l+1} - 1, \dots, x_L, c_{15})\tilde{N}_{\text{ext}}(x_1, \dots, x_l \\ & + 1, x_{l+1} - 1, \dots, x_L, c_{15}) \\ & + k_m(x_1, \dots, x_L, c_{15} - 1)\tilde{N}_{\text{ext}}(x_1, \dots, x_L, c_{15} - 1) \\ & + k_m(x_1, \dots, x_L, c_{15} + 1)\tilde{N}_{\text{ext}}(x_1, \dots, x_L, c_{15} + 1). \end{aligned} \quad (3.12)$$

Ovdje stope  $k_{m_{15}}(x_1, \dots, x_L, c_{15} \mp 1) = \frac{p_0}{\ln 4} (c_{15} \mp 1)\beta(x_1, \dots, x_L, c_{15} \mp 1)$  opisuju missegregaciju kromosoma 15.

Glavna prednost ovog pristupa je značajno smanjenje dimenzionalnosti vektorskog prostora makrokariotipa u usporedbi s dimenzionalnosti originalnog vektorskog prostora za kariotip. Primjerice, u slučaju stanice s  $L = 6$  i  $n = 20$ , broj mogućih makrokariotipa je  $L(n - 1)^{L-1} \approx 1.5 \cdot 10^7$ , što je 8 redova veličine manje od broja mogućih kariotipa  $L^n \approx 3.7 \cdot 10^{15}$ . Stoga, jednadžba (3.11) je jedinstven matematički alat koji nam omogućuje istraživanje evolucije tumorskih kariotipa opisujući velik broj stanica i kombinacija kariotipa.

Ova teorija omogućuje nam istraživanje evolucije kariotipa u raznim organizmima. U sljedećem poglavlju ćemo uspoređivati teorijske rezultate s eksperimentalnim rezultatima u

stanicama miša te predstaviti zaključke o mehanizmima evolucije tumora u mišu. Budući da je ova teorija vrlo generalna, može se primijeniti i na ljudske stanice te time pomoći razumijevanju razvoja tumora kod ljudi. Zbog kompleksnosti problematike, eksperimentalna istraživanja evolucije kariotipa u ljudskim stanicama još uvijek nedostaju. Osim primjene na stanice sisavaca, našu teoriju bilo bi vrlo zanimljivo primijeniti i na stanice kvasca te istražiti evoluciju kariotipa u kontekstu adaptacije na okolinu.

## 3.2 Rješenja modela

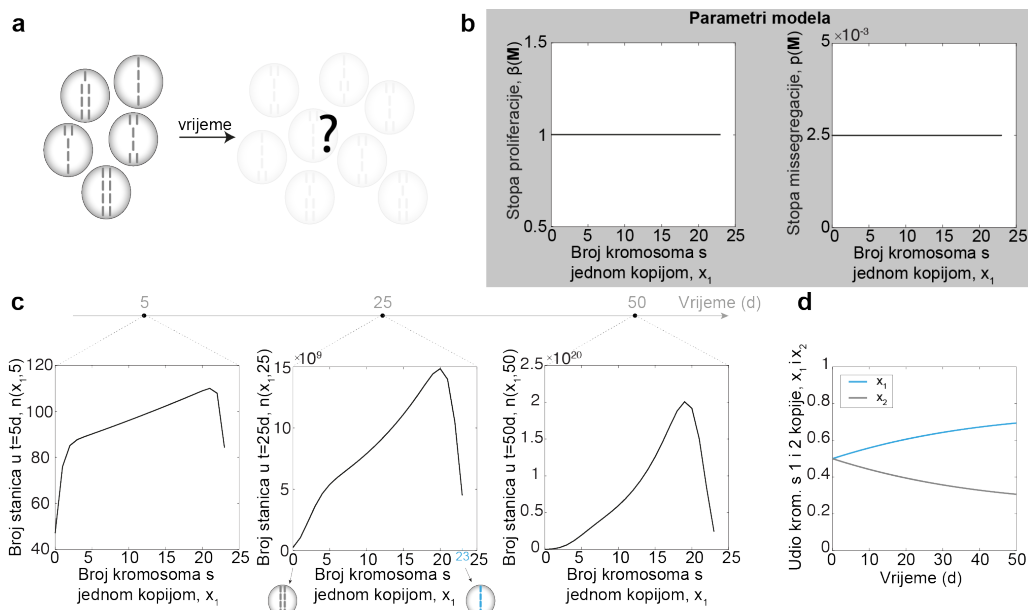
### 3.2.1 Stanice s maksimalno 2 kopije kromosoma

Budući da se prostor stanja drastično povećava s povećanjem broja kopija koje dopuštamo da kromosom može imati, istražujemo rješenja za najjednostavniji slučaj u kojem dopuštamo najviše dvije kopije kromosoma. U tom slučaju, vektor makrokariotipa se pojednostavljuje na  $\mathbf{M}(\mathbf{K}) = (x_1, x_2)$  te uzimajući u obzir zakon sačuvanja broja kromosoma  $x_1 + x_2 = 23$  dobivamo sustav koji ovisi samo o jednoj varijabli.

Početni uvjeti koje ćemo razmatrati u ovom poglavlju su (1) heterogeni početni uvjet koji obuhvaća po jednu stanicu svih makrokariotipa koji zadovoljavaju zakon sačuvanja. Ovakav početni uvjet simulira populaciju stanica različitih kariotipa koja je često prisutna kod tumorskih tkiva. Također, heterogeni početni uvjet omogućuje nam da lakše vidimo utjecaj određenih parametara na evoluciju kariotipa. (2) Homogeni početni uvjet koji podrazumijeva da krećemo od jedne ili više stanica s istim kariotipom, u našem slučaju to će biti diploidan kariotip, jer je to kariotip zdrave ljudske stanice. Ovakav početni uvjet je izuzetno zanimljiv jer nam omogućava da postavimo pitanje: „Kako se tumorski kariotip razvije iz zdrave diploidne stanice?“. Parametri modela koji utječu na evoluciju kariotipa su: (1) stopa kojom se stanice proliferiraju  $\beta$ , (2) vjerojatnost missegregacije  $p_m$ , (3) vjerojatnost apoptoze  $p_a$ . Svaki od ovih parametara može biti funkcija kariotipa. Eksperimentalna mjerenja ovih parametara još uvijek nisu potpuna budući da bi se za istu staničnu liniju određeni parametar trebao mjeriti za sve kariotipe, a precizna i sistematična perturbacija kariotipa u stanicama predstavlja izazov. Stoga ćemo iskoristiti prednosti teorijskog pristupa i istražiti kako različite kombinacije ovisnosti proliferacije i missegregacije o kariotipu utječu na evoluciju kariotipa. Kako bi smanjili broj parametara koji variramo, vjerojatnost apoptoze ćemo držati konstantnom a fokusirat ćemo se na istraživanje utjecaja proliferacije i missegregacije.

Rješavanjem jednadžbe (3.11) dobivamo kako se broj stanica svih mogućih kariotipa mijenja u vremenu te crtamo graf ovisnosti broja stanica u određenim vremenskim trenucima u ovisnosti o  $x_1$  koji određuje kariotip budući da je  $x_2$  implicitno zadan preko zakona sačuvanja. Prvo razmatramo slučaj u kojem krećemo od heterogenog početnog uvjeta i razmatramo kakav utjecaj na evoluciju kariotipa imaju konstantna proliferacija vrijednosti  $1d^{-1}$  i vjerojatnost missegregacije vrijednosti 0.0025 (**slika 3.2a i b**). Grafovi na **slici 3.2c** prokazuju broj stanica u ovisnosti o kariotipu nakon 5, 25 i 50 dana. Budući da se u ovom slučaju stanice dijele stopom  $1d^{-1}$ , broj dana odgovara broju dioba. Na apscisi se nalazi broj kromosoma s jednom kopijom,  $x_1$ , a budući da su za ovaj jednostavni slučaj  $x_1$  i  $x_2$  direktno povezani preko zakona sačuvanja kromosoma, prva vrijednost na  $x$ -osi,  $x_1 = 0$  ( $x_2 = 23$ ) označava diploidni kariotip, dok zadnja vrijednost na  $x$ -osi označava haploidni kariotip,  $x_1 = 23$  ( $x_2 = 20$ ). Iz ovih grafa možemo vidjeti da za konstantne vrijednosti proliferacije i missegregacije, početno heterogena populacija teži populaciji u kojoj dominiraju kromosomi s jednom kopijom. Ovo je posljedica prirode procesa missegregacije te rubnih uvjeta. Vjerojatnost missegregacije od 0.0025 odnosi se na vjerojatnost missegregacije jedne kopije kromosoma, stoga što stanica ima više kopija kromosoma veća je vjerojatnost da će izgubiti jednu od njih. Rubni uvjeti osiguravaju da stanice sa 0 kopija bilo kojeg kromosoma izbacujemo iz populacije kao i stanice koje imaju 3 ili više kopija nekog kromosoma. Prvi rubni uvjet predstavlja biološko ograničenje jer stanicama koje imaju 0 kopija nekog kromosoma nedostaju esencijalni geni bez kojih ne mogu funkcionirati dok je drugi rubni uvjet posljedica promatranja najjednostavnijeg matematičkog modela. Da bismo dobili dojam kako se broj stanica s jednom i dvije kopije kromosoma,  $x_1$  i  $x_2$ , mijenjaju u vremenu prikazali smo njihovu vremensku evoluciju (**slika 3.2d**). Iz ovog grafa također vidimo da početna populacija u kojoj su jednako zastupljeni  $x_1$  i  $x_2$  prelazi u populaciju u kojoj dominira  $x_1$ .



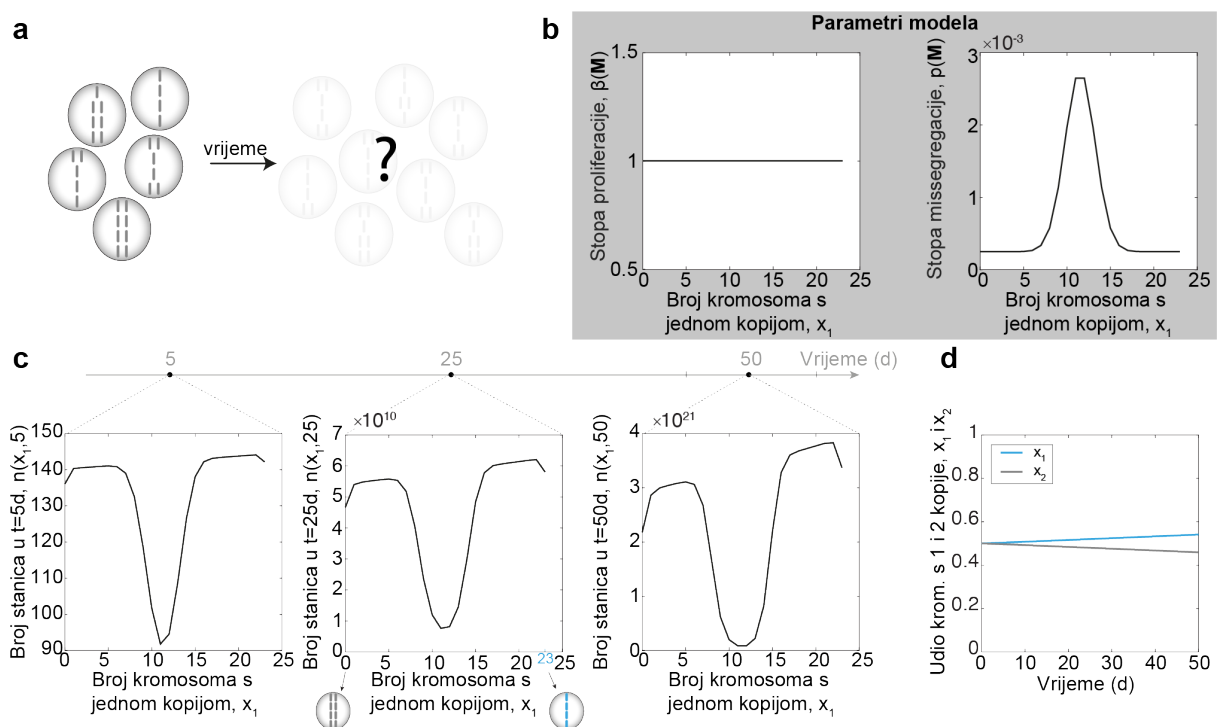


**Slika 3.2:** Evolucija heterogenog kariotipa uz konstantnu stopu proliferacije i vjerojatnost missegregacije tijekom 50 dana. **a**, skica heterogene populacija stanica koja tijekom vremena evoluiru u populaciju koju želimo istražiti našim modelom. **b**, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije u ovisnosti o kariotipu. **c**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu u vremenskim trenucima 5, 25 i 50 dana. **d**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 50 dana.

Kao što smo već spomenuli, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije mogu ovisiti o kariotipu. Eksperimentalna istraživanja pokazala su da stanice s nepravilnim kariotipom imaju značajno povećanu stopu missegregacije. Jedan takav primjer su HeLa stanice koje mogu imati između 70 i 164 kromosoma, a izmjerena stopa missegregacije za takve stanice je otprilike 0.001, dok je stopa missegregacije u diploidnim stanicama manja za otprilike jedan red veličine (Shi & King, 2005; Thompson & Compton, 2008). Kako bismo ispitali utjecaj missegregacije koja na ovakav način ovisi o kariotipu za vjerojatnost missegregacije uvodimo

funkcijsku ovisnost o kariotipu  $p_m(x_1) = 0.0025 e^{-\frac{(x_1 - \frac{23}{2})^2}{2\sigma_p^2}} + 0.00025$ , za koju će se haploidne i diploidne stanice missegregirati s vjerojatnosti koja približno iznosi 0.00025 dok će se stanice sa vrlo aneuploidnim kariotipima missegregirati s vjerojatnosti koja jedan red veličine veća (**slika 3.3b**). Oblik funkcije  $p_m(x_1)$  izabrali smo tako da možemo ispitati ideju da se stanice s visokim stupnjem aneuploidije najviše missegregiraju, iako egzaktna funkcijska ovisnost missegregacije o kariotipu nije poznata. Za širinu raspodjele uzeli smo  $\sigma_p = 3$  koji smo također proizvoljno odabrali. Početni uvjet ne mijenjamo u odnosu na **sliku 3.2** kao ni stopu proliferacije (**slika 3.3a i b**). Kako bi istražili utjecaj ovih parametara na evoluciju kariotipa crtamo grafove broja stanica u ovisnosti o kariotipu nakon 5, 25 i 50 dana (**slika 3.3c**). Glavna karakteristika ovih grafova je oblik slova „U“ u području vrlo aneuploidnih kariotipa.

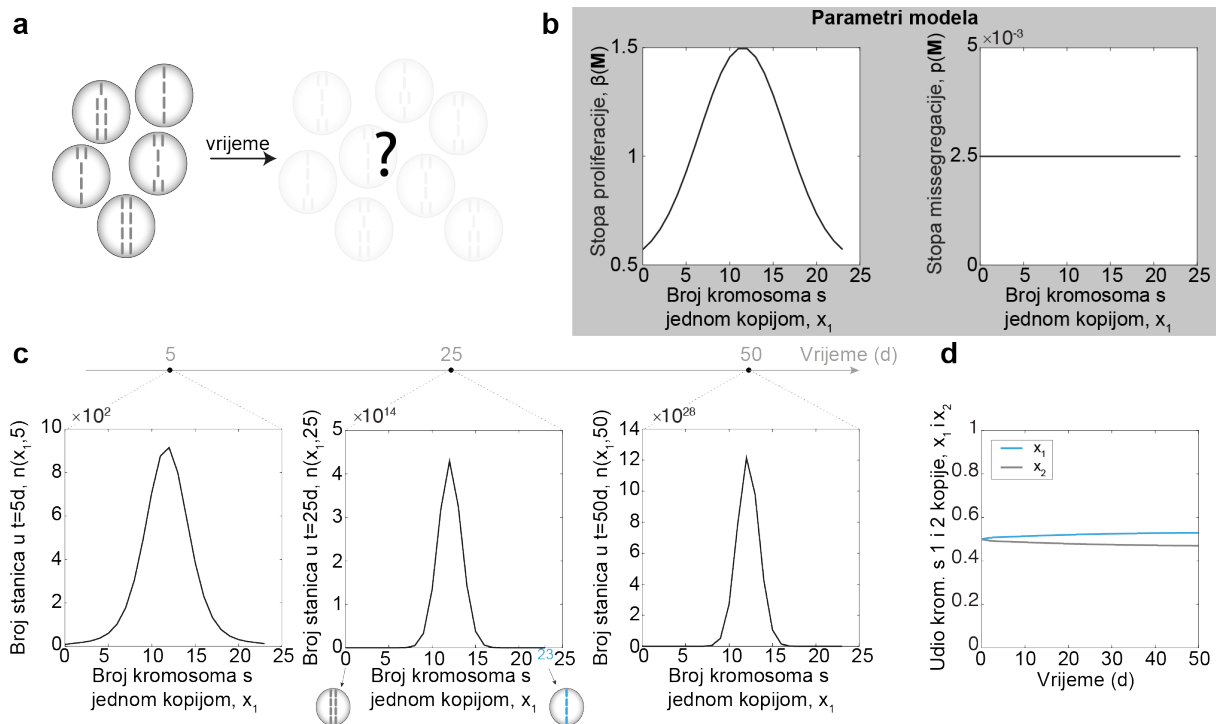
Odnosno, budući da se stanice s najvećim stupnjem aneuploidije najviše missegregiraju te tako „pune“ susjedna stanja, njih ima najmanje u populaciji. Populacijom dominiraju haploidne i diploidne stanice budući da je vjerojatnost missegregacije tih stanica najmanja. Opet možemo primijetiti da haploidnih stanica ima nešto više od diploidnih iako im je vjerojatnost missegregacije jednaka a posljedica tome je ista kao na **slici 3.2**. Dominacija stanica s jednom kopijom u odnosu na dvije može se vidjeti i u **grafu 3.3d** te u usporedbi sa **slikom 3.2d** gdje gotovo 70% kromosoma u populaciji ima jednu kopiju ovdje nemamo toliki nesrazmjer jer taj broj svega 55%.



**Slika 3.3:** Evolucija heterogenog kariotipa uz konstantnu stopu proliferacije i vjerojatnost missegregacije koja ovisi o kariotipu tijekom 50 dana. **a**, skica heterogene populacija stanica koja tijekom vremena evoluira u populaciju koju želimo istražiti našim modelom. **b**, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije u ovisnosti o kariotipu. **c**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu u vremenskim trenucim 5, 25 i 50 dana. **d**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 50 dana.

Budući da neka istraživanja ukazuju na to da kariotipi nekih tumorskih stanica rezultiraju ubrzanim procesom dijeljenja, provjeravamo kakav utjecaj na populaciju stanica kroz vrijeme ima proliferacija koja ovisi o kariotipu na način da se stanice s nepravilnim brojem kromosoma brže dijele (Duijf & Benezra, 2013; van Jaarsveld & Kops, 2016). Kako bi to implementirali u naš teorijski model za stopu proliferacije uzimamo funkciju koji doseže vrijednost  $1.5d^{-1}$  za stanice s najvišim stupnjom aneuploidije dok se haploidne i diploidne stanice dijele približno

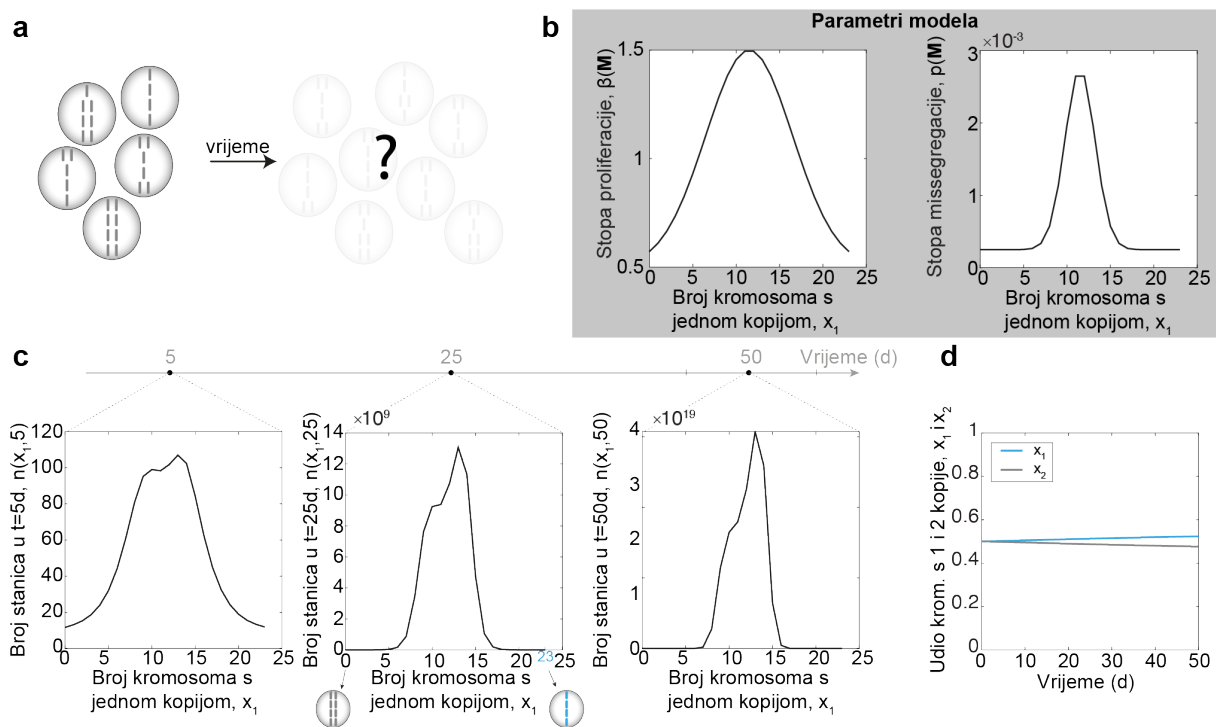
stopom od  $0.5d^{-1}$ ,  $\beta(x_1) = e^{-(x_1 - \frac{23}{2})^2 / 2\sigma_\beta^2} + 0.5$  (slika 3.4b). Slično kao za funkciju za vjerojatnost missegregacije,  $p_m(x_1)$ , budući da se ne zna egzaktna funkcijska ovisnost proliferacije o kariotipu, odabiremo ju proizvoljno tako da opisuje glavna poznata svojstva proliferacije. Također, za vrijednost širine raspodjele uzeli smo proizvoljno  $\sigma_\beta = 5$ . Početni uvjet je i dalje heterogen, a vjerojatnost missegregacije postavljamo na konstantnu vrijednost, slika 3.4a i b. Prikazom ovisnosti broja stanica o kariotipu možemo vidjeti da već nakon 5 dana populacijom počinju dominirati one stanice koje se najbrže dijele, a onda kroz vrijeme taj trend postaje sve izraženiji (slika 3.4c). Populacija stanica nakon 50 dana je jako heterogena jer dominiraju vrlo aneuploidne stanice dok haploidnih i diploidnih stanica ima relativno malo. No, kad usporedno prikažemo evoluciju broja kromosoma s jednom i dvije kopije u vremenu vidimo da stanice s jednom kopijom ima nešto više (slika 3.4d).



**Slika 3.4:** Evolucija heterogenog kariotipa uz stopu proliferacije koja ovisi o kariotipu i konstantnu vjerojatnost missegregacije tijekom 50 dana. **a**, skica heterogene populacija stanica koja tijekom vremena evoluira u populaciju koju želimo istražiti našim modelom. **b**, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije u ovisnosti o kariotipu. **c**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu u vremenskim trenucima 5, 25 i 50 dana. **d**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 50 dana.

Nakon što smo vidjeli pojedinačni utjecaj funkcijske ovisnosti missegregacije i proliferacije o kariotipu, istražujemo njihov simultani utjecaj na evoluciju kariotipa kada krenemo od heterogene populacije stanice (slika 3.5a i b). Rezultati pokazuju da već nakon 5 dana populacijom počinju dominirati aneuploidne stanice koje se brže proliferiraju iako se utjecaj

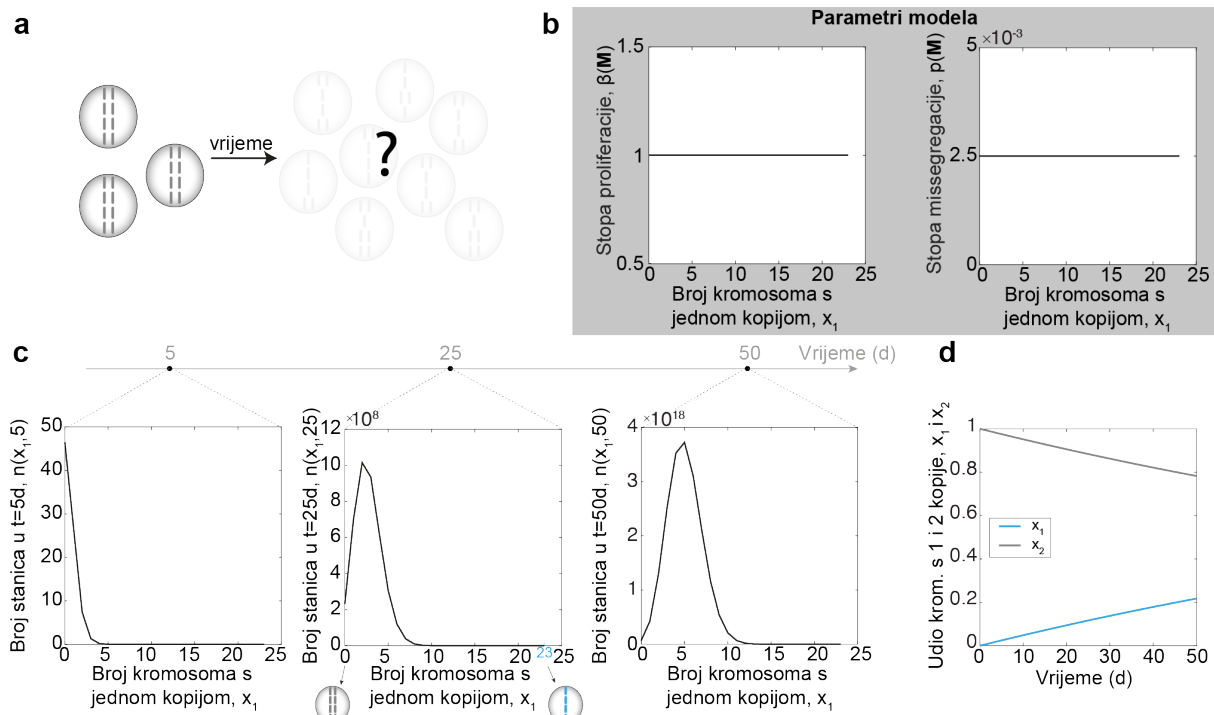
missegregacije može vidjeti za stanice s najvećim stupnjom aneuploidije ( $x_1 = 11$ ) kojih ima nešto manje u populaciji jer im je vjerojatnost missegregacije velika. Utjecaj velike stope missegregacije postaje s vremenom sve manje uočljiv te nakon 50 dana dominira utjecaj povećane proliferacije aneuploidnih stanica (**slika 3.5c**). Prikazom broja kromosoma s jednom i dvije kopije u vremenu vidimo gotovo isti trend kao na **slikama 3.3d i 3.4d (slika 3.5d)**.



**Slika 3.5:** Evolucija heterogenog kariotipa uz stopu proliferacije i vjerojatnost missegregacije koje ovise o kariotipu tijekom 50 dana. **a**, skica heterogene populacija stanica koja tijekom vremena evoluira u populaciju koju želimo istražiti našim modelom. **b**, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije u ovisnosti o kariotipu. **c**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu u vremenskim trenucima 5, 25 i 50 dana. **d**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 50 dana.

Pogledajmo sada što dobivamo ako za početni uvjet uzmemo populaciju diploidnih stanica (**slika 3.6a**). Kao i u slučaju s heterogenim početnim uvjetom krenut ćemo od slučaja kada su i proliferacija i missegregacija konstante s pripadnim vrijednostima od  $1d^{-1}$  i  $0.0025$  (**slika 3.6b**). Grafovi ovisnosti broja stanica o kariotipu nakon 5, 25 i 50 dana pokazuju da se broj diploidnih stanica u populaciji povećava no s vremenom, vrh na  $x_1 = 0$  se počinje translirati prema desno te u populaciji počinju dominirati aneuploidne stanice s kariotipom  $x_1 = 3$  nakon 25 dana, a nakon 50 dana populacijom dominira kariotip s 5 kromosoma s jednom kopijom,  $x_1 = 5$  (**slika 3.6c**). Ovaj efekt smo već spominjali u rezultatima za **sliku 3.2** a do njega dolazi zbog toga što se vjerojatnost missegregacije odnosi na jednu kopiju kromosoma, a budući da diploidna stanica ima duplo više kopija od haploidne stanice veća je vjerojatnost da će se

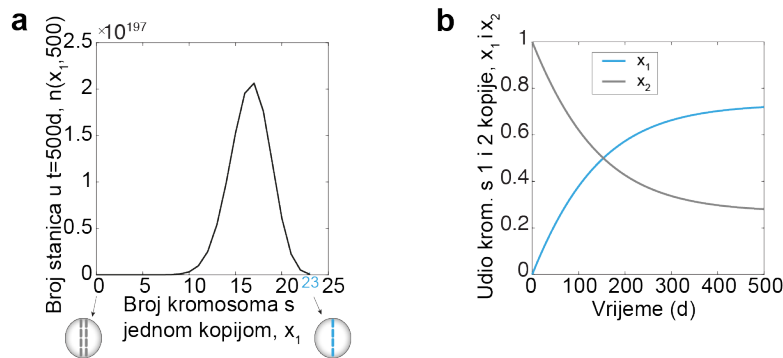
missegregirati diploidna stanica. Također, ovaj efekt može biti posljedica pojednostavljenog modela u kojem razmatramo samo dvije kopije dok stanice s više od dvije kopije nestaju iz populacije. No i dalje je ovaj model koristan kako bi se vidjeli utjecaji različitih parametara na evoluciju kariotipa. Crtanjem grafa za broj kromosoma s jednom i dvije kopije u vremenu vidimo da na početku sve stanice imaju dvije kopije kromosoma, no s vremenom taj broj opada a povećava se broj kromosoma s jednom kopijom (**slika 3.6d**).



**Slika 3.6:** Evolucija diploidnog kariotipa uz konstantnu stopu proliferacije i vjerojatnost missegregacije tijekom 50 dana. **a**, skica diploidne populacija stanica koja tijekom vremena evoluira u populaciju koju želimo istražiti našim modelom. **b**, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije u ovisnosti o kariotipu. **c**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu u vremenskim trenucima 5, 25 i 50 dana. **d**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 50 dana.

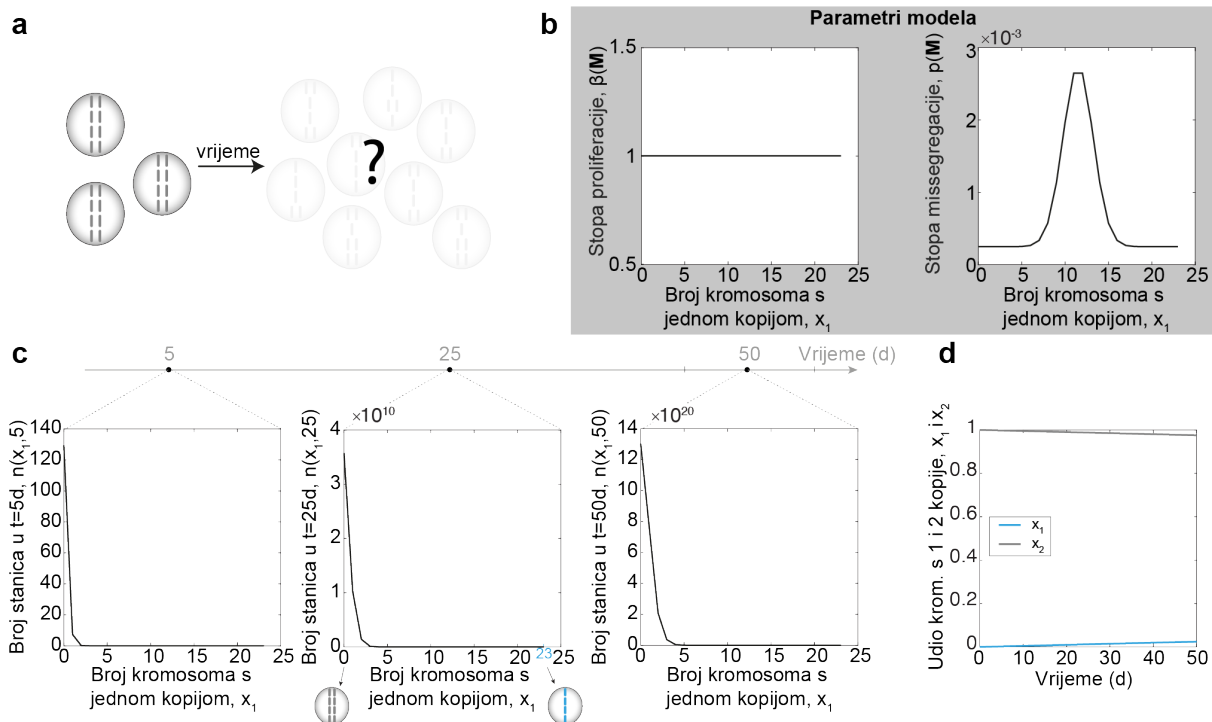
Budući da nakon 50 dana model nije ušao u stacionarni režim, zanimljivo je vidjeti što se događa nakon duljeg vremena, recimo 500 dana. No, ovdje treba biti na oprezu jer nakon 500 dana broj stanica naraste na broj koji nije relevantan za niti jedan organizam. Ovaj problem riješio bi se proširenjem modela tako da se zahtjeva da populacija ne može narasti više od određenog broja koji je relevantan za biološki sistem s kojim se uspoređuje, na način da kad sustav dosegne granični broj stanica, stanice se prestaju dijeliti. Radi jednostavnosti proučavanja osnovnih svojstava modela ovo ograničenje nije uključeno u model. U grafu koji prikazuje broj stanica vidimo da nakon 500 dana dominiraju stanice koje su vrlo blizu haploidnog kariotipa (**slika 3.7a**). To se također vidi na grafu evolucije broj kromosoma s

jednom i dvije kopije u vremenu gdje vidimo da se u početno diploidnoj populaciji smanjuje broj kromosoma s dvije kopije te se nakon 150 dana broj kromosoma s jednom i dvije kopije izjednačuje nakon čega prevladavaju kromosomi s jednom kopijom u populaciji (**slika 3.7b**).



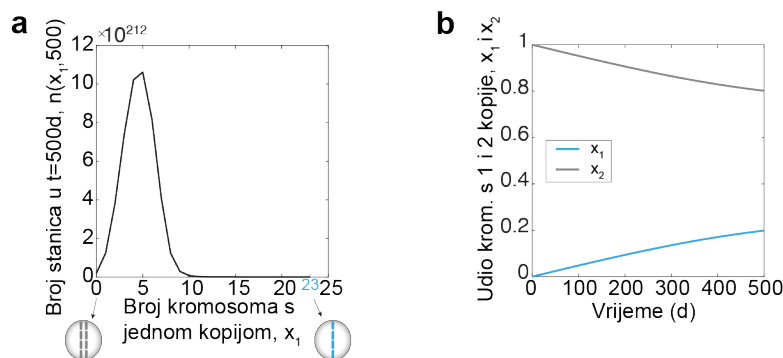
**Slika 3.7:** **a**, broj stanica kao funkcija kariotipa nakon  $t = 500$  dana. **b**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 500 dana.

Analogno slučaju sa heterogenim početnim uvjetom, provjeravamo kakav utjecaj na početnu diploidnu populaciju (**slika 3.8a**) ima missegregacija koja ovisi o kariotipu na način da vjerojatnost za missegregaciju raste sa stupnjem aneuploidije dok je za haploidne i diploidne stanice vrlo mala (**slika 3.8b**). Graf ovisnosti broja stanica o kariotipu u vremenskim trenucima 5, 25 i 50 dana pokazuje da početno diploidna populacija ostaje približno diploidna. Ovaj zanimljivi efekt upravo je rezultat povećanje missegregacije aneuploidnih stanica koja stvara „barijeru“ ovoj populaciji da pređe u populaciju koja je približno haploidna (**slika 3.8c**). Na **slici 3.8d** možemo vidjeti da se početni udjeli kromosoma sa dvije i jednom kopijom nisu puno promijenili tijekom 50 dana.



**Slika 3.8:** Evolucija diploidnog kariotipa uz konstantnu stopu proliferacije i vjerojatnost missegregacije koja ovisi o kariotipu tijekom 50 dana. **a**, skica diploidne populacije stanica koja tijekom vremena evoluiru u populaciju koju želimo istražiti našim modelom. **b**, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije u ovisnosti o kariotipu. **c**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu u vremenskim trenucima 5, 25 i 50 dana. **d**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 50 dana.

Ako opet pogledamo rezultate nakon dužeg vremenskog perioda, možemo vidjeti da se nakon 500 dana vrh distribucije translirao u desno na  $x_1 = 5$ , no i dalje u populaciji imamo dominantno dvije kopije kromosoma (**slika 3.9a i b**).

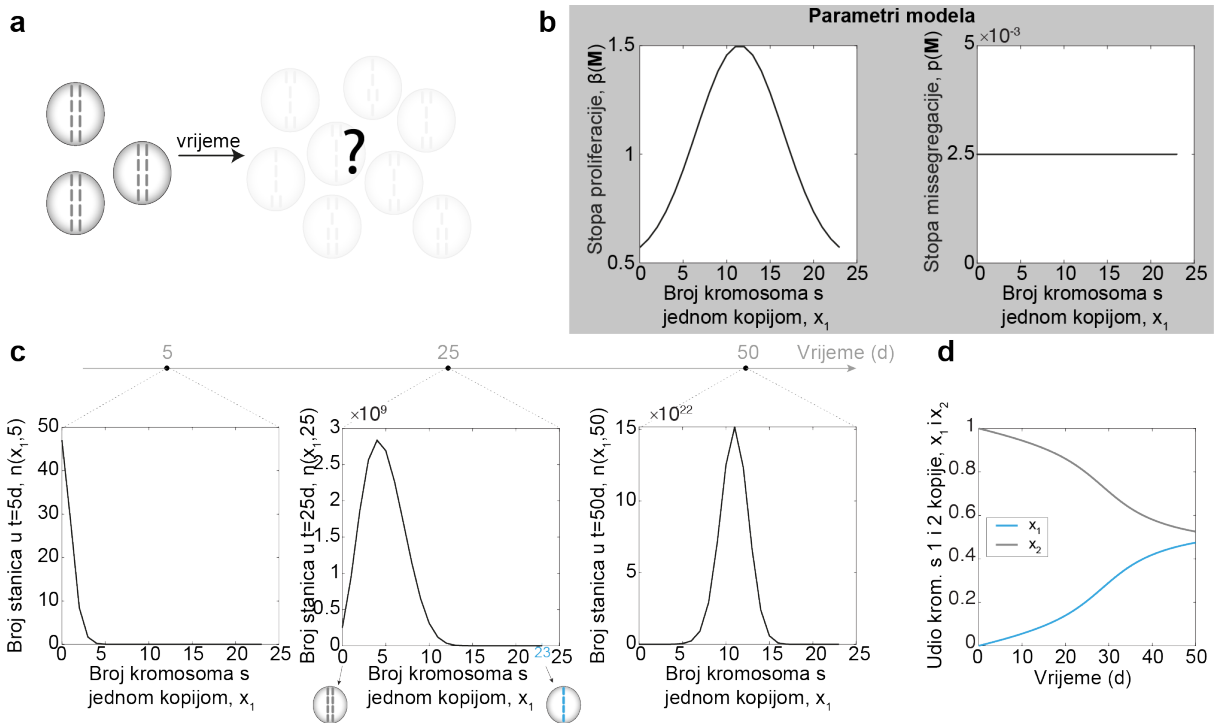


**Slika 3.9:** **a**, broj stanica kao funkcija kariotipa nakon  $t = 500$  dana. **b**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 500 dana.

Sada razmatramo na koji način proliferacija kao funkcija od kariotipa i konstantna missegregacija utječu na evoluciju diploidnih stanica (**slika 3.10 a i b**). Na **slici 3.10c** možemo vidjeti da nakon 50 dana populacijom počinju dominirati one stanice koje se najbrže proliferiraju. Ovaj rezultat vrlo je sličan rezultatu na **slici 3.4** gdje smo imali iste parametre, ali



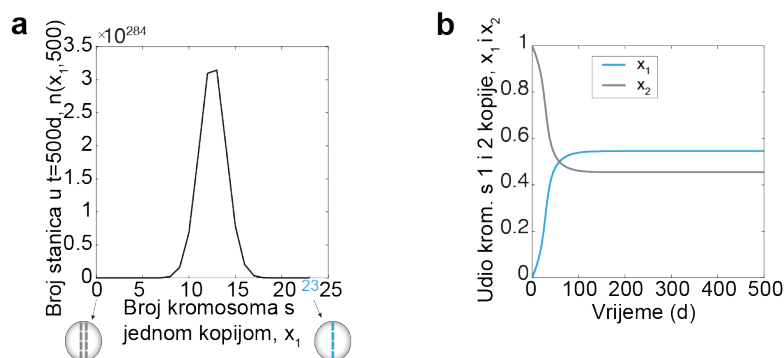
je početna populacija bila heterogena, stoga proliferacija ima vrlo snažan utjecaj na oblikovanje populacije kroz vrijeme. Evolucija broja kromosoma s jednom i dvije kopije pokazuje da je populacija nakon 50 dana vrlo heterogena gdje otprilike 50% kromosoma ima 1 kopiju (**slika 3.10d**)



**Slika 3.10:** Evolucija diploidnog kariotipa uz stopu proliferacije koja ovisi o kariotipu i konstantnu vjerojatnost missegregacije tijekom 50 dana. **a**, skica diploidne populacije stanica koja tijekom vremena evoluira u populaciju koju želimo istražiti našim modelom. **b**, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije u ovisnosti o kariotipu. **c**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu u vremenskim trenucima 5, 25 i 50 dana. **d**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 50 dana.

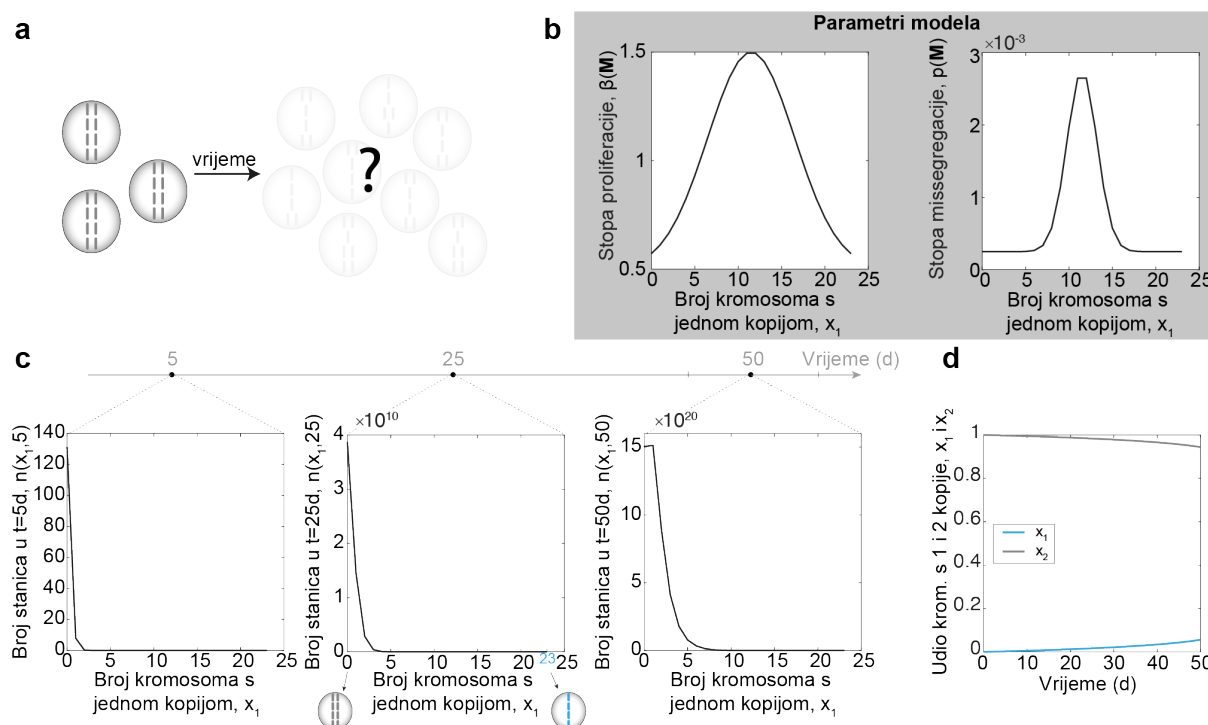
Ako pogledamo kako izgleda distribucija broja stanica nakon 500 dana vidimo da se vrh distribucije još malo translirao u desno na  $x_1 = 13$  te da se oblik distribucije nije puno promijenio (**slika 3.11a**). Ukoliko pogledamo evoluciju broja kromosoma s jednom i dvije kopije u vremenu vidimo da se početno diploidna populacija vrlo brzo postaje vrlo heterogena s otprilike 55% kromosoma koji imaju jednu kopiju i 45% kromosoma s dvije kopije (**slika 3.11b**), slično kao na **slici 3.4d**.





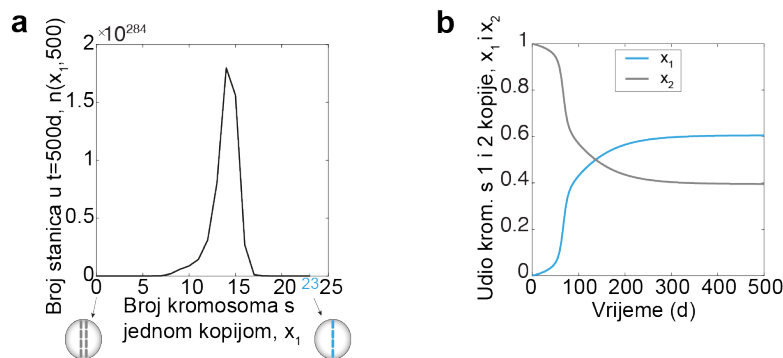
**Slika 3.11:** **a**, broj stanica kao funkcija kariotipa nakon  $t = 500$  dana. **b**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 500 dana.

Provjerimo sada što se dešava s populacijom diploidnih stanica kada su i proliferacija i missegregacija funkcije kariotipa (**slika 3.12a i b**). Na **slici 3.12c** vidimo da početno diploidna populacija ostaje dominantno diploidna prvih 50 dana. Razlog tomu je to što je vjerojatnost missegregacije diploidnih stanica vrlo mala, a proliferacija sporija u odnosu na aneuploidne stanice. Slično vidimo i iz **slike 3.12d**, no nelinearna promjena broj kromosoma s jednom i dvije kopije između 40 i 50 dana daje naznaku da će se populacije značajnije mijenjati ako pogledamo duži vremenski period.



**Slika 3.12:** Evolucija diploidnog kariotipa uz stopu proliferacije i vjerojatnost missegregacije koje ovise o kariotipu tijekom 50 dana. **a**, skica diploidne populacije stanica koja tijekom vremena evoluiru u populaciju koju želimo istražiti našim modelom. **b**, stopa proliferacije i vjerojatnost missegregacije u ovisnosti o kariotipu. **c**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu u vremenskim trenucim 5, 25 i 50 dana. **d**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 50 dana.

Nakon 500 dana vidimo da populacijom u konačnici dominiraju one stanice koje se najbrže proliferiraju, no zbog smanjene missegregacije diploidnih stanica te povećanje missegregacije aneuploidnih stanica trebalo je duže vremena da se u populaciji pojave visoko aneuploidne stanice koje se najbrže proliferiraju (**slika 3.13a**). Za razliku od distribucije na **slici 3.11a** gdje je samo proliferacija bila funkcija vremena dok je missegregacija konstantna, ova distribucija nije simetrična i vrh joj je malo pomaknut u desno. Razlog tomu je upravo to što iako se visoko aneuploidne stanice najbrže proliferiraju, one također imaju najveću vjerojatnost missegregacije zbog čega taj kariotip nije stabilan u populaciji. Također na **slici 3.13b** vidimo da se u početku broj kromosoma s jednom i dvije kopije mijenjaju sporije u odnosu na slučaj prikazan na **slici 3.11b** upravo zbog male vjerojatnost missegregacije diploidnih stanica, a kad se u populaciji pojave aneuploidne stanice koje se brže proliferiraju promjena broja kromosoma s jednom i dvije kopije postaje brža.



**Slika 3.13:** **a**, broj stanica kao funkcija kariotipa nakon  $t = 500$  dana. **b**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija) i 2 ( $x_2$ , siva linija) tijekom 500 dana.

Ovaj jednostavni model sa 2 kopije kromosoma poslužio nam je da proučimo utjecaj glavnih parametara na evoluciju kariotipa. Pokazali smo da ukoliko imamo funkcijsku ovisnost missegregacije o kariotipu, populacijom će dominirati euploidni kariotipi dok kariotipi s visokim stupnjem aneuploidije neće biti povoljni zbog velike vjerojatnost missegregacije. Nasuprot tome, u slučaju funkcijske ovisnosti proliferacije o kariotipu, populacijom dominiraju kariotipi s visokim stupnjem aneuploidije. Također smo istražili slučaj kada i missegregacija i proliferacija imaju funkcijsku ovisnost o kariotipu te smo pokazali da u početku imamo kompeticiju između ova dva mehanizma no vrlo brzo utjecaj proliferacije na populaciju postaje dominantan.

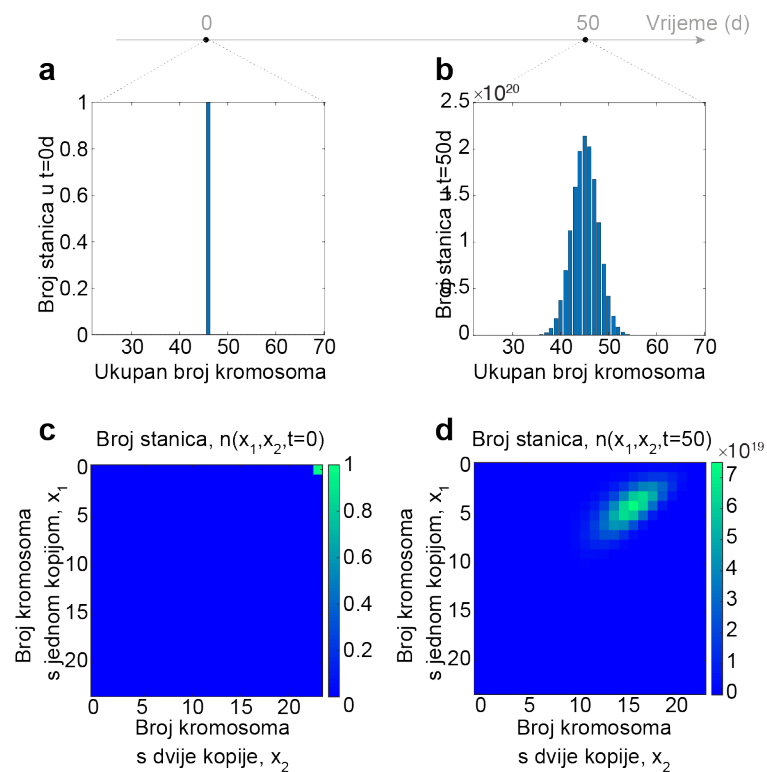
### 3.2.2 Stanice s maksimalno 3 kopije kromosoma

Povećanjem maksimalnog broja kopija kromosoma, povećava se broj kombinacija koje kariotip može imati, a time dimenzionalnost i kompleksnost sustava. Vektor makrokariotipa sada poprima oblik  $\mathbf{M}(\mathbf{K}) = (x_1, x_2, x_3)$ , a uzimajući u obzir zakon sačuvanja broja kromosoma,  $x_1 + x_2 + x_3 = 23$ , dobivamo sustav koji ovisi o dvije varijable. Povećanje maksimalnog broja kopija u sustavu, osim što predstavlja veći izazov prilikom istraživanja parametarskog prostora, također otežava grafički prikaz rezultata.

Analogno slučaju s dvije kopije, analizirat ćemo utjecaj proliferacije i missegregacije na evoluciju kariotipa. U prethodnom poglavlju prvo smo analizirali utjecaj parametara na evoluciju heterogene populacije stanica zato što se na tom primjeru lakše vidi kako parametri oblikuju populaciju kroz vrijeme. No, u ovom poglavlju ćemo krenuti analizu s diploidnim početnim uvjetom budući da je biološki više relevantno. U prvom koraku istražujemo utjecaj konstantne proliferacije vrijednosti  $1d^{-1}$  i konstantne missegregacije vrijednosti 0.0025 na evoluciju jedne diploidne stanice (**slika 3.14 a**). Budući da je kariotip određen sa dvije varijable,  $x_1$  i  $x_2$ , kako bi prikazali broj stanica u 2D grafu, na apscisu stavljamo ukupan broj kromosoma,  $1 \cdot x_1 + 2 \cdot x_2 + 3 \cdot x_3$ , dok je na ordinati ukupan broj stanica svih kariotipa koji sadrže određeni ukupni broj kromosoma. Na **slici 3.14 a i b** prikazana je distribucija broja stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma u početnom trenutku te nakon 50 dana. Od jedne stanice na ukupnom broju kromosoma 46 nakon 50 dana dobili smo populaciju u kojoj većina stanica ima ukupni broj kromosoma između 35 i 55, dok najviše stanica ima ukupno 45 kromosoma. Nedostatak ovakvog prikaza rezultata je što ne znamo o kakvom se kariotipu zaista radi jer vrlo različiti kariotipi mogu imati isti ukupan broj kromosoma. Tako primjerice ukupan broj kromosoma 45 može imati kariotip koji je vrlo blizu diploidnom kariotipu, ali i vrlo aneuploidni kariotipi mogu imati ukupan broj kromosoma 45.

Ovisnost broja stanica o kariotipu u početnom trenutku te nakon 50 dana prikazana u trodimenzionalnom grafu gdje je na apscisi broj kromosoma s dvije kopije,  $x_2$ , na ordinati broj kromosoma s jednom kopijom,  $x_1$ , dok boja označava broj stanica (**slika 3.14 c i d**). Za lakše čitanje grafova dobro je locirati položaje euploidnih kariotipova. Haploidni kariotip nalazi se u donjem lijevom kutu koji odgovara položaju  $x_1 = 23, x_2 = 0$ , diploidni kariotip nalazi se u gornjem desnom kutu koji odgovara položaju  $x_1 = 0, x_2 = 23$ , dok se triploidni kariotip nalazi u gornjem lijevom kutu na položaju  $x_1 = 0, x_2 = 0$ . Trokut kojeg zatvaraju ova tri položaja sadrži kariotipe koji zadovoljavaju zakon sačuvanja kromosoma,  $x_1 + x_2 + x_3 = 23$  dok kariotipi izvan tog područja (donji desni trokut na **slici 3.14 c** čiji se pravi kut nalazi na poziciji

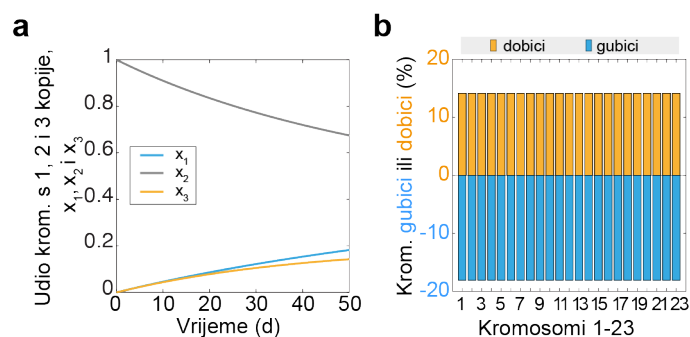
$x_1 = 23, x_2 = 23$ ) ne zadovoljavaju zakon sačuvanja i ne mogu se realizirati te ih stoga ne razmatramo. Na **slici 3.14 c** prikazana je jedna diploidna stanica koja predstavlja početni uvjet, a nakon 50 dana uz konstantnu proliferaciju od  $1d^{-1}$  i missegregaciju od 0.0025 populacijom dominiraju aneuploidne stanice čija je distribucija centrirana oko makrokariotipa  $\mathbf{M(K)} = (4, 16, 3)$ , **slika 3.14d**. Za razliku od **grafa 3.14b** iz kojeg bi se dalo naslutiti da populacijom i nakon 50 dana dominiraju diploidni ili približno diploidni kariotipi budući da je da je vrh distribucije na ukupnom broju kromosoma 45, iz **grafa 3.14d** dobivamo kompletnu informaciju o makrokariotipu populacije.



**Slika 3.14:** Evolucija diploidnog kariotipa s konstantnom proliferacijom i missegregacijom. **a**, broj stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma. Prikazana je jedna diploidna stanica ukupnog broja kromosoma 46 koja predstavlja početni uvjet,  $t = 0$ . **b**, broj stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma nakon 50 dana. **c**, jedna diploidna stanica u trenutku  $t = 0$  prikazana u grafu gdje je na apscisi ovisnost o  $x_2$ , na ordinati  $x_1$  dok boja označava broj stanica. **d**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu nakon 50 dana.

Evolucija broja kromosoma s 1, 2 i 3 kopije pokazuje da udio kromosoma s dvije kopije opada tijekom 50 dana, dok udio kromosoma s jednom i tri kopije raste (**slika 3.15a**) što je u skladu s rezultatima **slike 3.14**. Precizna propagacija diploidnog kariotipa vrlo je važna za razvoj zdravog organizma, stoga taj kariotip uzimamo kao referentni. Svaka devijacija od tog kariotipa uzrokovana je greškom tijekom diobe te rezultira kariotipima s kromosomskim

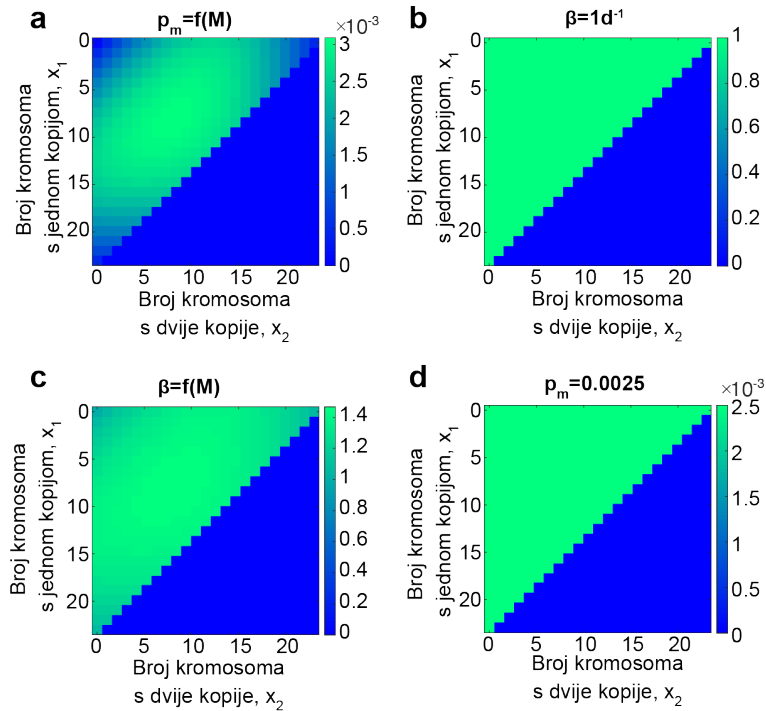
dobicima ili gubicima. Kromosomski gubici predstavljaju udio kromosoma s jednom kopijom u određenoj vremenskoj točki, dok kromosomski dobici predstavljaju udio kromosoma sa 3 ili više kopija u određenoj vremenskoj točki. Budući da krećemo od jedne diploidne stanice, kromosomski dobici i gubici u tom trenutno su 0, no nakon 50 dana možemo vidjeti da imamo populaciju aneuploidnih stanica u kojoj je udio kromosomskih dobitaka 14% dok je udio kromosomskih gubitaka 18%. **Graf 3.15b** izračunat je iz modela srednjeg polja iz kojeg možemo izračunati prosječni dobitak po kromosomu, dok varijacije između dobitaka i gubitaka pojedinih kromosoma ne možemo izračunati. Kromosomski dobici i gubici čest su način za kvantifikaciju aneuploidnih tumorskih kariotipa te se u kombinaciji s teorijom mogu se donijeti zaključci o glavnim mehanizmima koji dovode do karakterističnih kromosomskih dobitaka i gubitaka.



**Slika 3.15:** **a**, evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija), 2 ( $x_2$ , siva linija) i 3 ( $x_3$ , žuta linija) kopije u populaciji tijekom 50 dana. **b**, Kromosomski dobici (žuti stupci) i gubici (plavi stupci) nakon 50 dana.

Za daljnje istraživanje utjecaja missegregacije i proliferacije na evoluciju kariotipa osim konstantne vrijednosti jednog i drugog parametra koje smo analizirali u slikama 3.14 i 3.15 također ćemo istražiti sljedeće slučajeve: (i) vjerojatnost missegregacije kao funkciju makrokariotipa  $\mathbf{M}(\mathbf{K}) = (x_1, x_2, x_3)$  dok je proliferacija konstantna (slika 3.16a i b). Vjerojatnost missegregacije ovisi o kariotipu na način da euploidni kariotipi kao i kariotipi u okolini euploidnog stanja imaju malu vjerojatnost missegregacije. Povećanjem stupnja aneuploidije, povećava se vjerojatnost missegregacije. Odabrali smo funkciju koja opisuje spomenutu ovisnost o makrokariotipu,  $p_m(x_1, x_2) = p_{aneu}[(1 - x_1/n) + (p_{eu}/p_{aneu})] \cdot [(1 - x_2/n) + (p_{eu}/p_{aneu})] \cdot [(1 - (n - x_1 - x_2)/n) + (p_{eu}/p_{aneu})]$ , gdje je  $p_{aneu} = 0.01$ ,  $p_{eu} = 0.0001$  i  $n = 23$ . Ovako odabrana funkcija za haploidni makrokariotip,  $\mathbf{M}(\mathbf{K}) = (23, 0, 0)$ , daje vjerojatnost missegregacije vrijednost blizu parametra  $p_{eu}$  dok će u slučaju aneuploidnog kariotipa ta vrijednost biti tim veća što je veći stupanj aneuploidije; (ii) kada je stopa proliferacije funkcija makrokariotipa, a vjerojatnost missegregacije konstantna (slika

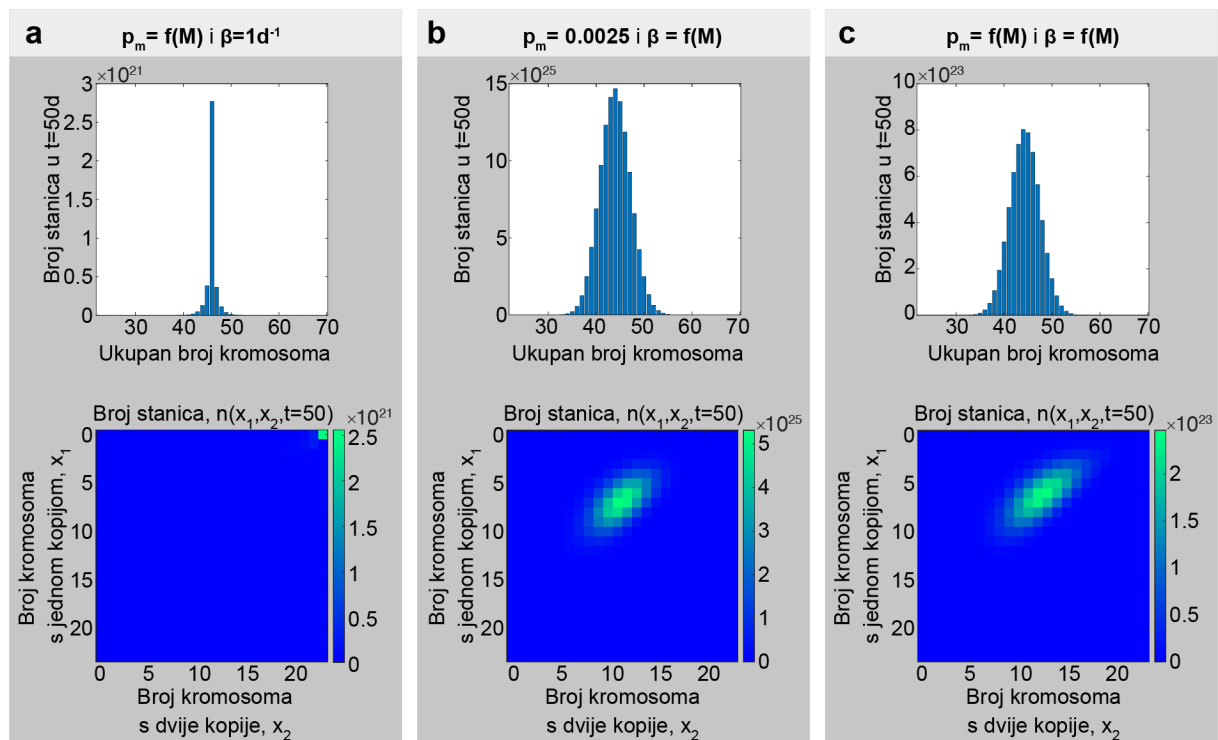
**3.16c i d).** Stopa proliferacije ovisi o kariotipu na način da se proliferacije da je proliferacija za euploidne stanice jednaka  $1d^{-1}$  te se povećava kako idemo prema sredini gornjeg trokuta na **slici 3.16c** gdje se nalaze visoko aneuploidne stanice. Funkcijsku ovisnost proliferacije izrazili smo kao  $B(x_1, x_2) = b_{eu} + b_{aneu}(1 - (x_1/n)) \cdot (1 - (x_2/n)) \cdot (1 - (n - x_1 - x_2)/n)$ , gdje su  $b_{eu} = 1d^{-1}$  i  $b_{aneu} = 1.6d^{-1}$ ; (iii) zadnji slučaj koji ćemo promatrati je kada su i proliferacija i missegregacija funkcije kariotipa, **slike 3.16a i c.**



**Slika 3.16:** Parametri proliferacije i missegregacije. **a**, missegregacija kao funkcija kariotipa gdje haploidni, diploidni i triploidni kariotip imaju malu vjerojatnost missegregacije koja se povećava s povećanjem stupnja aneuploidije (sredina gornjeg trokuta), **b**, konstantna stopa proliferacije za sve kariotipe koji zadovoljavaju zakon sačuvanja broja kromosoma,  $x_1 + x_2 + x_3 = 23$ . **c**, proliferacija kao funkcija kariotipa gdje se haploidni, diploidni i triploidni kariotipi proliferiraju malo sporije u usporedbi s aneuploidnim kariotipima. **d**, konstantna vjerojatnost missegregacije za sve kariotipe koji zadovoljavaju zakonsačuvanja.

Broj stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma kao i broj stanica u ovisnosti o kariotipu za  $t = 50$  d prikazani su na **slici 3.17a** za slučaj konstantne proliferacije i vjerojatnosti missegregacije koja je funkcija kariotipa. U gornjem grafu **slike 3.17a** imamo usku distribuciju oko ukupnog broja kromosoma 46, dok u donjem grafu istog panela vidimo da u toj distribuciji upravo dominiraju stanice diploidnog kariotipa. Ovakav rezultat posljedica je male vjerojatnosti missegregacije euploidnih stanica, a budući da smo krenuli od jedne diploidne stanice koja se prema ovim parametrima vrlo precizno dijeli, njihov broj je u populaciji rastao. Za slučaj kada je missegregacija konstantna, odmah uočavamo da je distribucija stanica šira s ukupnim

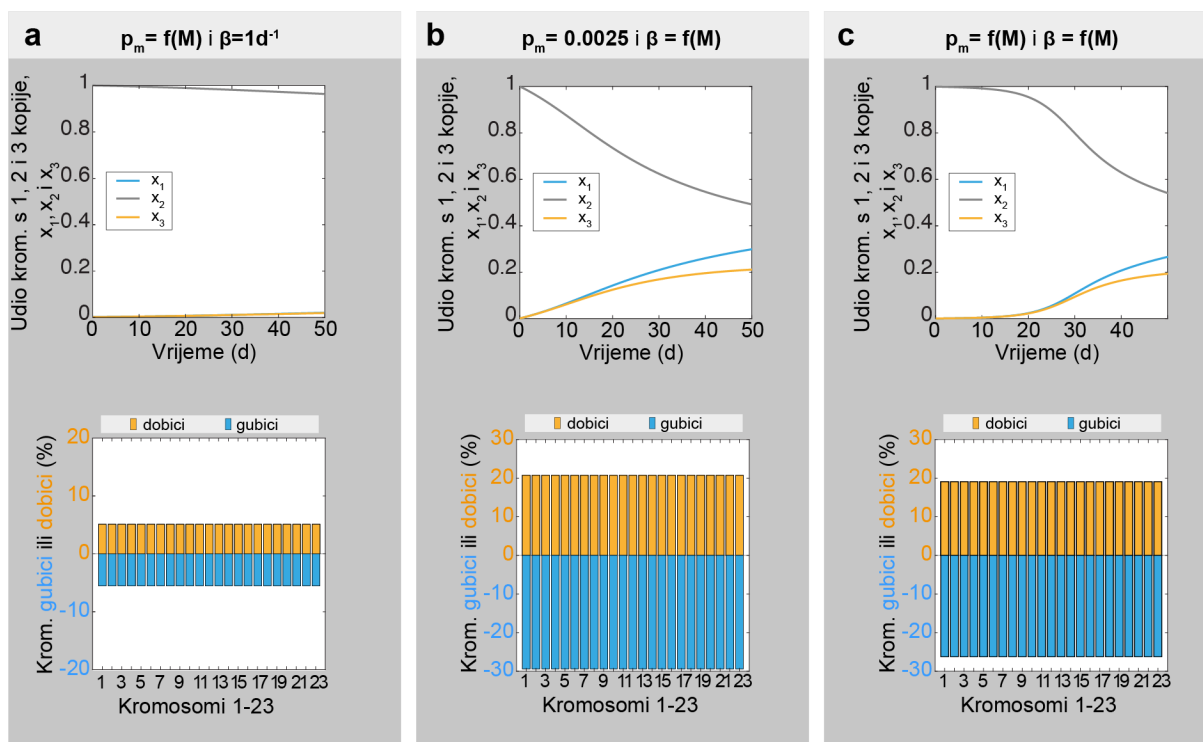
brojevima kromosoma između 35 i 55, gornji graf na **slici 3.17b**. Vrh distribucije sada se nalazi na ukupnom broju kromosoma 44 što je i dalje blizu diploidnog ukupnog broja kromosoma, no ako pogledamo donji graf na **slici 3.17b** gdje je prikazana ovisnost broja stanica o kariotipu vidimo da imamo vrlo aneuploidnu populaciju u kojoj dominiraju stanice s makrokariotipom  $\mathbf{M}(\mathbf{K}) = (7, 11, 5)$ . Proliferacija koja je povećana za aneuploidne stanice ima snažan efekt na evoluciju populacije stanica na način da kasnije u vremenu u populaciji dominiraju stanice koje se najbrže dijele. Stoga, ovi rezultati sugeriraju da će dominirati one stanice koje imaju povećanu proliferaciju ili one koje imaju smanjenu vjerojatnost missegregacije (usporedi panele **panele 3.17a i b**). Na kraju razmatramo slučaj kada i proliferacija i missegregacija imaju funkcijsku ovisnost o kariotipu (**slika 3.17c**). Možemo vidjeti da se nakon 50 dana dominantno vide efekti proliferacije budući da distribucija u gornjem i donjem grafu panela c slični onima iz panela b. No možemo primijetiti da je broj stanica u panelu c za dva reda veličine manji nego u panelu b što je vjerojatno posljedica toga što je početnoj diploidnoj stanici trebalo duže vremena da se missegregira budući da je vjerojatnost missegregacije mala.



**Slika 3.17:** Distribucija broja stanica za tri kombinacije parametara u  $t = 50$  dana. Gornji grafovi u panelima prikazuju broj stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma dok donji grafovi prikazuju broj stanica u ovisnosti o kariotipu. **a**, vjerojatnost missegregacije ima funkcijsku ovisnost o makrokariotipu dok je proliferacija konstantna. **b**, stopa proliferacije ima funkcijsku ovisnost o makrokariotipu dok je missegregacija konstantna. **c**, i proliferacija i missegregacija su funkcije makrokariotipa.

Pogledajmo također kako ova tri odabira parametara utječu na evoluciju broja kromosoma s 1, 2 i 3 kopije kao i kromosomske dobitke i gubitke. Na **slici 3.18a** vidimo da se broj kromosoma s 1, 2 i 3 kopije vrlo malo promijenio tijekom 50 dana (gornji panel) te da nakon 50 dana u populaciji imamo svega 5% kromosomskih dobitaka i gubitaka (donji panel). Ova opažanja u skladu su sa grafovima na **slici 3.17a** koji pokazuju usku distribuciju oko ukupnog broja 46 te da je većina kariotipa u distribuciji upravo diploidna. Iako distribucije u grafovima na **slici 3.17 b i c** izgledaju vrlo slično, možemo primijetiti razliku u evoluciji  $x_1$ ,  $x_2$  i  $x_3$  (**slike 3.18b i c**). U gornjem grafu **slike 3.18b** broj kromosoma sa dvije kopije na početku gotovo linearno opada s vremenom dok brojevi kromosoma s 1 i 3 kopije linearno rastu dok na **slici 3.18c** tijekom prvih 10 dana populacija ostaje pretežno diploidna nakon čega se broj kromosoma s dvije kopije kreće smanjivati. Razlog različitoj dinamici evolucije ovih kariotipa je upravo to što je u slučaju sa **slike 3.18b** missegregacija konstantna za sve kariotipe ali je veća u usporedbi s vjerojatnosti missegregacije za euploidne kariotipe u slučaju **slike 3.18c**. Upravo zbog jako male missegregacije, kariotip na **slici 3.18c** duže ostaje u diploidnom stanju no jednom kada se desi missegregacija, proliferativna prednost koju imaju aneuploidne stanice nadjača efekt smanjene missegregacije euploida. Kromosomski dobici i gubici u donjim panelima **slike 3.18b i c** su slični te otprilike 4 puta veći nego na **slici 3.18a**.

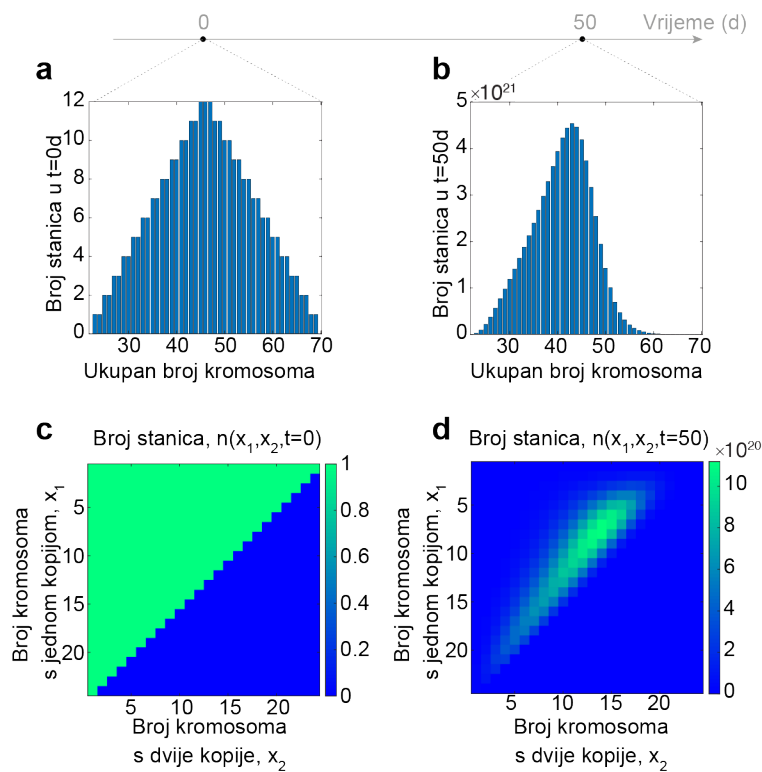




**Slika 3.18:** Gornji grafovi u panelima prikazuju evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija), 2 ( $x_2$ , siva linija) i 3 ( $x_3$ , žuta linija) kopije u populaciji tijekom 50 dana, donji grafovi prikazuju kromosomske dobitke (žuti stupići) i gubitke (plavi stupići) za  $t = 50$  dana. **a**, vjerojatnost missegregacije ima funkcijsku ovisnost o makrokariotipu dok je proliferacija konstantna. **b**, stopa proliferacije ima funkcijsku ovisnost o makrokariotipu dok je missegregacija konstantna. **c**, i proliferacija i missegregacija su funkcije makrokariotipa.

Analognu analizu parametara napraviti ćemo za heterogeni početni uvjet. Prvo razmatramo slučaj u kojem su vjerojatnost missegregacije i stopa proliferacije konstante s pripadnim vrijednostima od 0.0025 i  $1d^{-1}$ . Na **slici 3.19a** prikazan je heterogeni početni uvjet koji podrazumijeva da je broj stanica jednak za sve dostupne makrokariotipe. Ukoliko prikažemo ovisnost broja stanica o ukupnom broju kromosoma dobiva se neuniformna distribucija jer se kod aneuploidnih kariotipa isti broj kromosoma može ostvariti za više različitih makrokariotipa. Tako primjerice ukupni broj kromosoma 25 možemo ostvariti s 2 makrokariotipa, onim u kojem dva kromosoma imaju dvije kopije dok ostali imaju jednu  $\mathbf{M}(\mathbf{K}) = (21, 2, 0)$ , ili ukoliko jedan kromosom ima tri kopije a ostali jednu  $\mathbf{M}(\mathbf{K}) = (22, 0, 1)$ . Ukupni brojevi kromosoma 45, 46 i 47 se mogu ostvariti s najviše različitih makrokariotipa. Distribucija broja stanica s određenim ukupnim brojem kromosoma nakon 50 dana prikazana je na **slici 3.19b**. Vrh ove distribucije nalazi se na ukupnom broju kromosoma 43 dok je početna distribucija imala najviše stanica s ukupnim brojem kromosoma 45, 46 i 47. Također vidimo da distribucija nakon 50 dana nije simetrična te da broj stanica s ukupnim brojem kromosoma

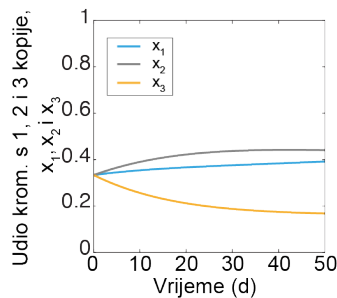
većim od 43 brzo opada. Budući da u **slikama 3.19a i b** izostaje informacija o kariotipu pogledajmo kako izgleda ovisnost broja stanica o kariotipu nakon 50 dana prikazana u trodimenzionalnom grafu gdje je na apscisi broj kromosoma s dvije kopije,  $x_2$ , na ordinati broj kromosoma s jednom kopijom,  $x_1$ , dok boja označava broj stanica. Heterogeni početni uvjet prikazan je na **slici 3.19c** gdje vidimo da je broj stanica sa svim dostupnim makrokariotipima koji zadovoljavaju zakon sačuvanja jednak 1. Donji trokut na **slici 3.19c** predstavlja kombinacije  $x_1, x_2$  i  $x_3$  koje ne zadovoljavaju zakon sačuvanja stoga je broj stanica u tom području jednak 0. Nakon 50 dana vidimo da dominiraju stanice duž dijagonale koje odgovaraju kariotipima s malim brojem kromosoma s 3 kopije (dijagonala odgovara  $x_3 = 0$ , **slika 3.19d**).



**Slika 3.19:** Evolucija heterogenog kariotipa s konstantnom proliferacijom i missegregacijom. **a**, broj stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma. Prikazan je heterogeni početni uvjet koji sadrži jednu stanicu svakog kariotipa koji zadovoljava zakon sačuvanja,  $x_1 + x_2 + x_3 = 23$ , prikazan u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma. **b**, broj stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma nakon 50 dana. **c**, heterogeni početni uvjet prikazan u grafu gdje je na apscisi ovisnost o  $x_2$ , na ordinati  $x_1$  dok boja označava broj stanica. **d**, broj stanica u ovisnosti o kariotipu nakon 50 dana.

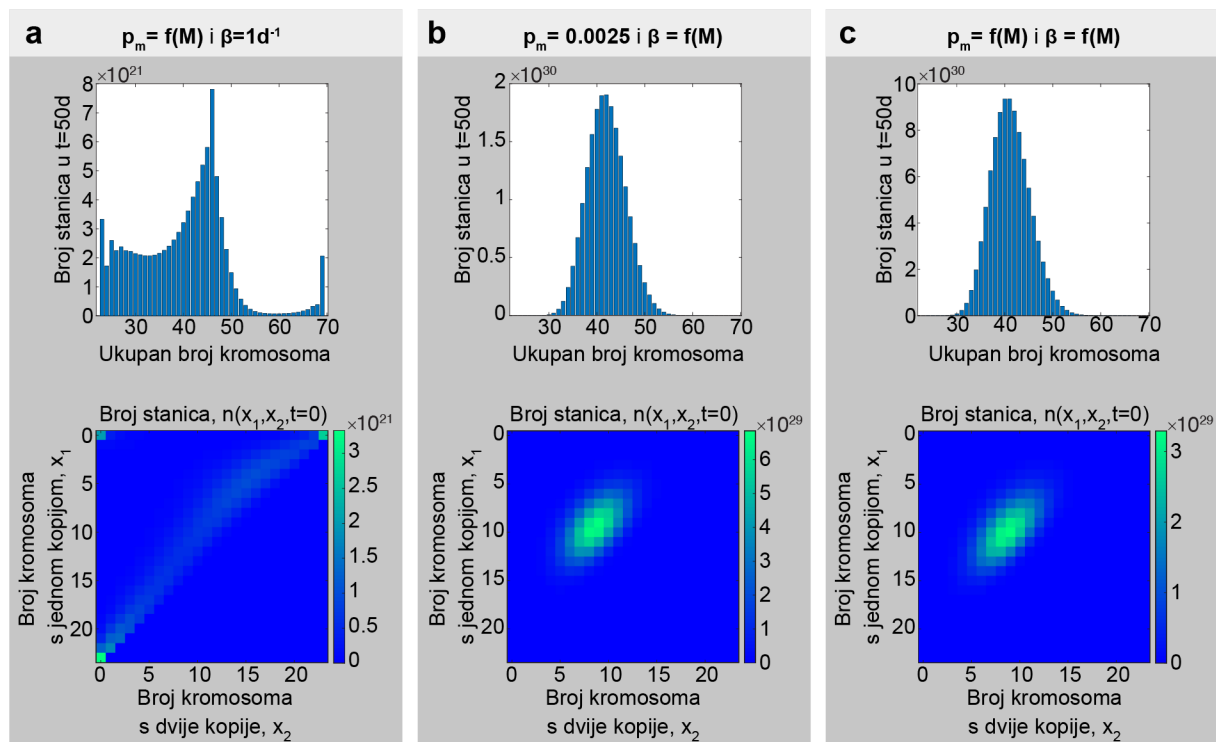
Evolution of chromosome number with 1, 2 and 3 copies shows that the proportion of chromosomes with three copies decreases during 50 days, the proportion of cells with two copies at the beginning grows fastest, but then reaches saturation while the proportion of cells with one copy monotonically increases (**slika 3.20**). Budući da

kromosomske dobitke i gubitke ima smisla razmatrati samo za populaciju koja je potekla od diploidnog početnog uvjeta ovdje ih nećemo razmatrati.



**Slika 3.20:** Evolucija udjela kromosoma s 1 ( $x_1$ , plava linija), 2 ( $x_2$ , siva linija) i 3 ( $x_3$ , žuta linija) kopije u populaciji tijekom 50 dana za konstantnu porliferaciju i missegregaciju.

Nadalje promatramo kako različite kombinacije parametara missegregacije i proliferacije oblikuju početno heterogenu populaciju. U gornjem panelu **slike 3.21a** možemo vidjeti vrlo zanimljivu distribuciju broja stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma u kojoj se ističe broj stanica s ukupnim broj kromosoma 46, no također dominiraju i stanice ukupnim brojevima kromosoma 23 i 69. Ovi brojevi kromosoma upravo odgovaraju brojevima kromosoma diploidnog, haploidnog i triploidnog kariotipa te se iz donjeg panela **slike 3.21a** možemo uvjeriti da ti kariotipi zaista dominiraju populacijom. Također možemo primijetiti da distribucija u gornjem panelu **slike 3.21a** nije simetrična te da su u populaciji više zastupljene stanice s ukupnim brojem kromosoma manjim od 46. To je također vidljivo na donjem grafu **slike 3.21a** gdje imamo stanice koje se protežu dijagonalom od donjeg lijevog do gornjeg desnog kuta duž koje je  $x_3$  mali ili 0. Distribucije na **slikama 3.21b i c** izgledaju gotovo identično bez obzira što je u panelu b missegregacija konstantna dok je u panelu c i missegregacija funkcija kariotipa. Razlog tomu je što krećemo od heterogenog početnog uvjeta u kojem su prisutni svi kariotipi koji zadovoljavaju zakon sačuvanja stoga stanice koje se brže proliferiraju odmah počnu dominirati populacijom te zasjene efekte missegregacije. Evolucija broja kromosoma s 1, 2 i 3 kopije za konstantnu proliferaciju i missegregaciju koja ovisi o kariotipu vrlo je slična onoj na **slici 3.20**. Za slučaj proliferacije koja ovisi o kariotipu, neovisno je li u kombinaciji s konstantnom missegregacijom ili missegregacijom koja ovisi o vremenu, trendovi su i dalje slični onima sa **slike 3.20** osim što nakon otprilike 30 dana broj kromosoma s jednom kopijom prevlada broj kromosoma s dvije kopije (grafove za evoluciju  $x_1, x_2$  i  $x_3$  za sve slučajeve parametara ne prikazujemo odvojeno budući da su vrlo slični onima na **slici 3.20**).



**Slika 3.21:** Distribucija broja stanica za tri kombinacije parametara u  $t = 50$  dana. Gornji grafovi u panelima prikazuju broj stanica u ovisnosti o ukupnom broju kromosoma dok donji grafovi prikazuju broj stanica u ovisnosti o kariotipu. **a**, vjerojatnost missegregacije ima funkcijsku ovisnost o makrokariotipu dok je proliferacija konstantna. **b**, stopa proliferacije ima funkcijsku ovisnost o makrokariotipu dok je missegregacija konstantna. **c**, i proliferacija i missegregacija su funkcije makrokariotipa.

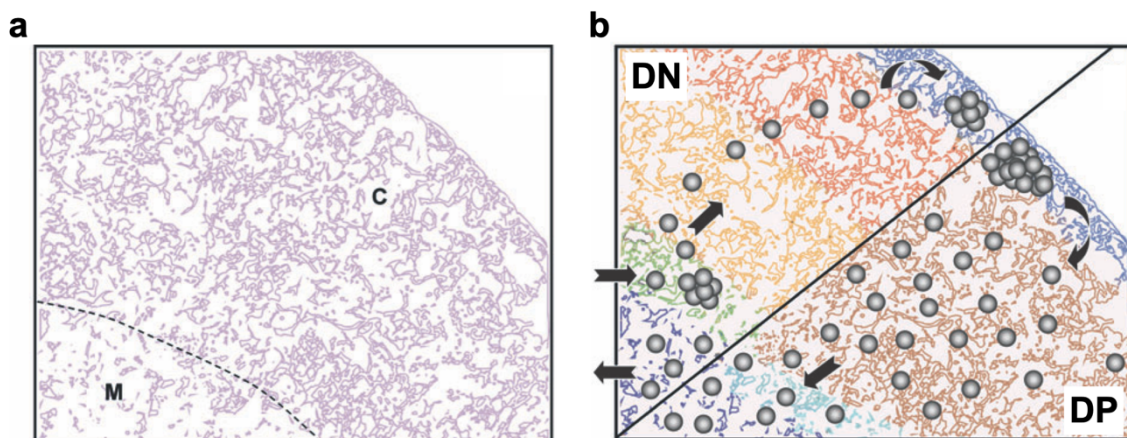
Analizom parametara za model koji dopušta do tri kopije kromosoma pokazali smo da kada imamo funkcijsku ovisnost missegregacije o kariotipu početno diploidan kariotip ostaje približno diploidan dok u slučaju heterogenog početnog uvjeta, populacijom kroz vrijeme počinju dominirati euploidni kariotipi. U slučaju funkcijske ovisnosti proliferacije o kariotipu populacijom počnu dominirati kariotipi s visokim stupnjem aneuploidije, neovisno o tome je li missegregacija konstanta ili funkcija kariotipa i o tome kakva je početna populacija. Stoga zaključujemo da proliferacija ima snažan utjecaj na oblikovanje populacije kroz vrijeme.

Proširenje na sustav koji dopušta 4 kopije kromosoma značajno utječe na analizu parametarskog prostora kao i na prikaz rezultata. S obzirom na to da u sustavu sa 4 kopije imamo 3 slobodne varijable, za takve rezultate je potreban četverodimenzionalni grafički prikaz. Međutim, u mnogim situacijama je potrebno razmatrati kariotipe u kojima broj kromosomskih kopija može biti veći od 3 pa je onda nužno proučavati i takve sustave bez obzira na njihovu kompleksnost.

## 4 Evolucija tumorskih kariotipa miša i njihova teorijska interpretacija

U ovom poglavlju primijenit ćemo teorijski model koji dopušta do 4 kopije kromosoma kako bismo bolje razumjeli eksperimente za evoluciju tumorskih kariotipa kod miševa. Kako bi eksperimentalno istražili evoluciju tumorskih kariotipa, naši suradnici osmislili su eksperimentalni mišji model pogodan za takvo istraživanje. Mišji model je genetski modificiran miš pogodan za eksperimentalno istraživanje određenog svojstva. U ovom slučaju perturbiran je nadzorni sustav u stanicama koji osigurava da su svi kromosomi poravnati prije njihovog razdvajanja što uzrokuje povećanu stopu missegregacije u tkivima odraslog miša. Ovakav mišji model pogodan je za sistemsko analizu utjecaja missegregacije, odnosno kromosomskih gubitaka i dobitaka na evoluciju kariotipa.

Analizom ovog mišjeg modela pokazano je da je 70% stanica koštane srži aneuploidno, a oko 76% miševa razvije limfom timusa, tumor središnjeg organa imunološkog sustava. Timus ili prsna žlijezda ima važnu ulogu u sazrijevanju T-limfocita, obrambenih stanica koje mogu prepoznati i ukloniti razne strane faktore u organizmu. T-limfociti potječu od stanica predaka u koštanoj srži i zatim migriraju u timus radi sazrijevanja, selekcije i kasnijeg transporta u krv. Na **slici 4.1a** prikazan je poprečni presjek timusa u kojem se ocrtavaju konture epitelnih stanica koje čine matricu za kretanje T-limfocita unutar timusa. Glavni cilj eksperimenata suradnika je istražiti kako visoke stope missegregacije utječu na sazrijevanje T-limfocita i jesu li uzrok pojave limfoma.



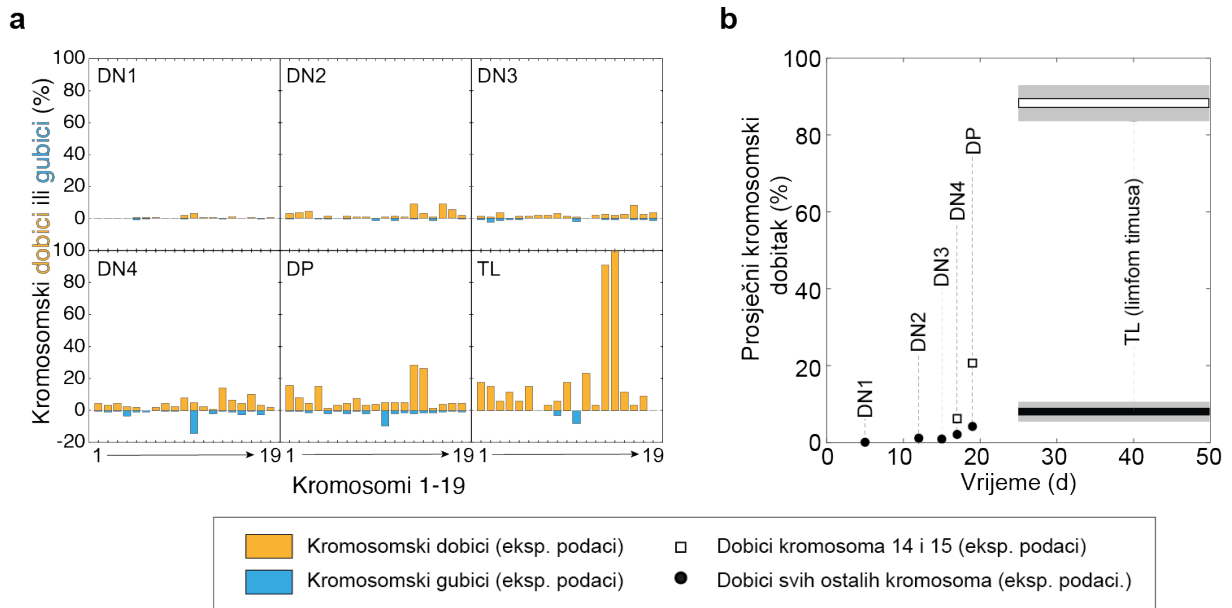
**Slika 4.1:** Poprečni presjek timusa. **a**, Isprekidanom crtom označene su granice između medule (M) i korteksa (C) timusa. **b**, migracija T-stanica unutar timusa. Dijagonalna linija dijeli zone karakteristične po kretanju stanica prema van, DN stanice od onih karakterističnih kretanjem prema unutra, DP stanice.

Sazrijevanje T-limfocita odvija se unutar nekoliko funkcionalno različitih signalnih zona koje se mogu podijeliti u dvije vrlo različite faze migracije unutar timusa. Svaka T-stanica na staničnoj membrani može izražavati dva specifična receptore koji joj omogućavaju prepoznavanje određenih antigena (antigen je molekula koja potiče stvaranje antitijela što je osnova imune reakcije organizma). U najranijim fazama, T-stanice migriraju iz koštane srži u timus te još nemaju izražen niti jedan receptor T-stanice stoga se ta faza zove dvostruko negativna faza. Dvostruko negativna faza može se podijeliti u četiri podkategorije, DN1, DN2, DN3 i DN4 gdje svaka predstavlja signalno mikrokruženje te tako formiraju strukturirani slijed u sazrijevanju T-stanica. Za ovu fazu karakteristično je usmjereno kretanje T-stanica prema periferiji timusa (gornji trokut na **slici 4.1b**). Slijedeći stadij sazrijevanja karakterističan je po tome što T-stanice imaju izražena oba receptora na svojoj površini stoga se ta faza naziva dvostruko pozitivna (DP) faza. Ovu fazu karakterizira kretanje prema unutrašnjosti timusa (donji trokut **slike 4.1b**) te pozitivna i negativna selekcija koja osigurava da eliminaciju nefunkcionalnih stanica. Stoga, samo dio stanica iz DP faze postaje funkcionalno zrelo. Ukoliko nešto pođe po krivu u procesu sazrijevanja, može doći do razvoja limfoma T-stanica.

## 4.1 Rješenja modela za predtumorske stanice miša

Kako bi eksperimentalno istražili evoluciju kariotipa, naši suradnici su uzeli T-stanice u različitim fazama sazrijevanja, odnosno iz različitih dijelova timusa te analizom svake stanice kvantificirali kromosomske dobitke i gubitke u mišjem modelu s povećanom missegregacijom (**slika 4.2a**). Generalno iz **slike 4.2a** možemo vidjeti da predtumorske stanice imaju malo kromosomskih dobitaka i gubitaka, odnosno većina stanica ima diploidan kariotip. Tijekom sljedećih faza (DN4 i DP) možemo vidjeti da je postotak stanica s alteriranim kariotipom veći i također možemo primijetiti da ima više stanica s kromosomskim dobitkom (žuti stupići) nego stanica s kromosomskim gubitkom (plavi stupići). No, kariotip stanica koje su razvile limfom timusa ima značajno drugačiji kariotip od stanica u prethodnim fazama kojeg karakterizira visoka zastupljenost kromosoma 14 i 15, skoro sve kvantificirane stanice imaju višak kromosoma 14 i 15. Kao što smo već spomenuli, sazrijevanje T-stanica je vrlo dobro strukturirano i poznate su eksperimentalne procjene koliko dugo vremena stanica provedu u svakoj fazi sazrijevanja (Porritt et al., 2003). Stoga, ukoliko eksperimentalno izmjerene kromosomske dobitke stavimo u vremensku perspektivu, dobivamo njihovu vremensku evoluciju (**slika 4.2b**). Budući da su dobitci kromosoma 14 i 15 počinju izražavati već u DN4

fazi, kvantificiramo ih odvojeno drugih kromosoma (dobici drugih kromosoma označeni su crnim kružićima dok su dobici kromosoma 14 i 15 označeni bijelim pravokutnicima, **slika 4.2b**). Cilj naše teorije je razumjeti koji mehanizmi oblikuju evoluciju kromosomskih gubitaka iz **slike 4.2**, od dominacije trisomija u odnosu na monosomije što se vidi već u ranim fazama razvoja T-stanica, do pojave vrlo specifičnih kariotipa s viškom kromosoma 14 i 15 u stanicama limfoma timusa.

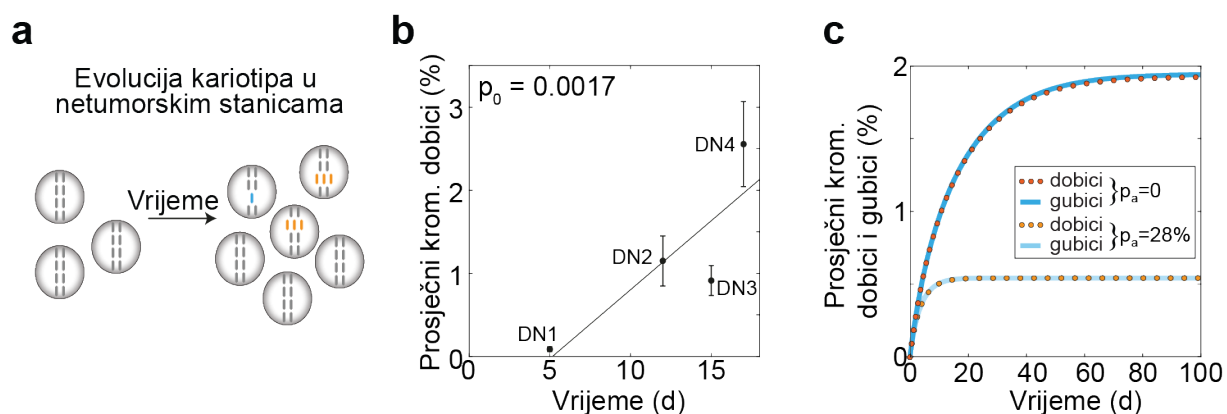


**Slika 4.2:** Eksperimentalno kvantificirani kariotipi u različitim fazama razvoja T-limfocita. **a**, Kromosomski dobici (žuti stupići) i kromosomski gubici (plavi stupići) kvantificirani za eksperimentalni mišji model s povećanom missegregacijom (Trakala et al., 2021). **b**, Kromosomski dobici poredani na vremensku os gdje su točke za određenu fazu ucrtane na sredinu intervala trajanja te faze. Za DN4, DP i TL stanice odvojeno su kvantificirani kromosomi 14 i 15 (bijeli pravokutnici) od drugih kromosoma (crni kružići).

Prvo istražujemo pod kojim uvjetima kromosomski dobici dominiraju u usporedbi s gubitcima u ranim fazama razvoja, i kako se kao posljedica toga razvijaju specifični tumorski kariotipi u kasnijim fazama razvoja timusa. Za istraživanje evolucije makrokariotipa počevši od više diploidnih stanica (**slika 4.3a**), rješavamo jednadžbu (3.11), za koju prvo procjenjujemo parametre (vidi Tablicu 1). Za euploidne stanice, koristimo stopu proliferacije vrijednosti  $\beta(\mathbf{K}_{2n}) = \ln 2 \text{ d}^{-1}$ , koja je izračunata na temelju vremena života T-limfocita u najranijim fazama razvoja, DN1-DN3 (Petrie & Zúñiga-Pflücker, 2007). Za aneuploidne stanice, stopa proliferacije je  $\beta(\mathbf{K} \neq \mathbf{K}_{2n}) = 0.8 \ln 2 \text{ d}^{-1}$ , zato jer se aneuploidne stanice proliferiraju otprilike 20% sporije od euploidnih stanica (Hintzen et al., 2021; Williams et al., 2008b). Budući da u modelu miša korištenom u (Trakala et al., 2021) sve stanice imaju istu vjerojatnost missegregacije kromosoma neovisno o kariotipu, u našem modelu koristimo istu vrijednost



parametra za vjerojatnost missegregacije za euploidne i aneuploidne kariotipe. Budući da ne postoje direktna mjerenja za stopu missegregacije za ovaj model miša, mi ju procjenjujemo iz jednadžbe (3.6) u režimu malih kromosomskih dobitaka  $\text{dobitak} \ll 100\%$  i malog broja generacija u kojem vrijedi linearna ovisnost,  $\text{dobitak} = p_0 t / t_0$  (vidi poglavlje Dodatak). Stoga smo stopu missegregacije dobili iz linearne regresije eksperimentalno izmjerenih kromosomskih dobitaka kroz DN1-DN4 faze, i ona iznosi  $p_0 = 0.0017$  (slika 4.3b, tablica 1). Budući da stopa apoptoze nije mjerena za ovaj model miša, koristimo je kao slobodan parametar i procjenjujemo ga kasnije iz usporedbe rezultata modela s eksperimentima.

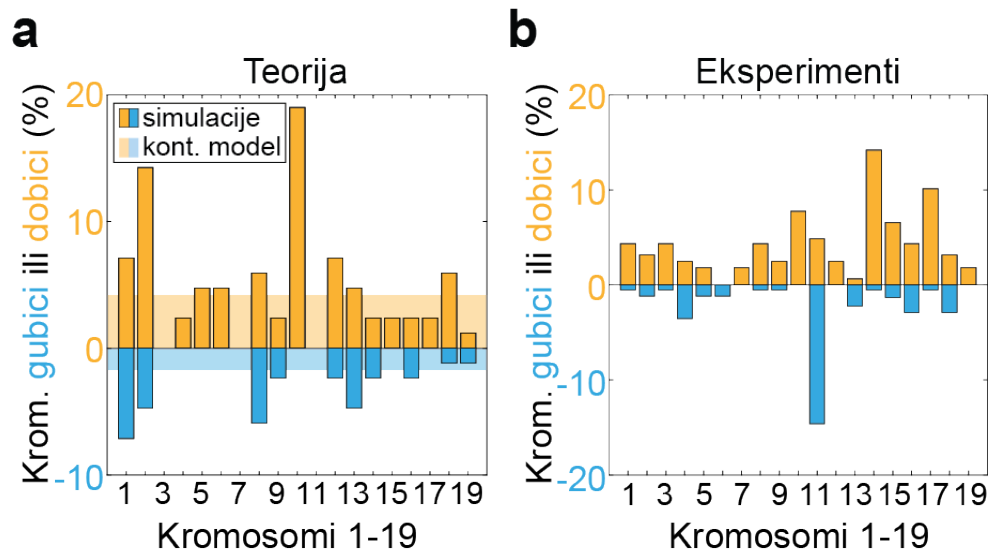


**Slika 4.3:** **a**, Shema koja prikazuje stanice koje sadrže dvije kopije kromosoma (sivi štapići), jednu kopiju (plavi štapići) te tri kopije kromosoma (žuti štapići) u dvije vremenske točke. **b**, Eksperimentalno izmjereni prosječni dobitak kromosoma tijekom rano razvoja T-limfocita, za faze DN1-DN4 (crni krugovi) kojima je procijenjeno trajanje redom 10 dana, 4 dana, 2 dana i 2 dana (Porritt et al., 2003). Eksperimentalne točke postavljene su na sredini trajanja svake faze. Linija predstavlja linearni fit,  $\text{dobitak} = p_0 t + \text{odsječak}$ . **c**, Prosječni dobitci kromosoma (točkaste narančaste linije) i gubici (pune plave linije) u vremenu izračunati kontinuiranim „makrokariotip“ modelom za  $p_a(\mathbf{K}) = 0$  (tamnonarančasta i tamnoplava) i  $p_a(\mathbf{K} \neq \mathbf{K}_{2n}) = 28\%$  (svijetlonarančasta i svijetloplava).

Kako bismo istražili kako se kariotipi mijenjaju u vremenu, rješavamo jednadžbu (3.11) i prikazujemo kromosomske dobitke i gubitke u vremenu. Iz rezultata prikazanim na **slici 4.3c** vidimo da kromosomski dobitci i gubici prate istu putanju i dosežu sličnu asimptotsku vrijednost. Ovaj rezultat je u suprotnosti s eksperimentalnim opažanjima koji pokazuju da su kromosomski dobitci dva puta više zastupljeni u stanicama nego kromosomski gubici (Trakala et al., 2021). Kako bismo objasnili ove eksperimentalne rezultate, razmatramo 2 scenarija: (S1) stanice s monosomijama učestalije podliježu apoptozi ili (S2) stanice s monosomijama se sporije dijele. Za testiranje scenarija S1, koristimo vjerojatnost apoptoze za monosomije  $p_a(\mathbf{K}_-) = 28\%$ , dok ostale stanice ne podliježu apoptozi. Zanimaju nas kariotipi nakon vremena  $t = 17$  d, jer to vrijeme odgovara eksperimentalno procijenjenom vremenu stadiju



DN4 koji je zadnji stadij u kojem nema značajnog odstupanja u kromosomskim dobitcima za specifične kromosome. Model predviđa prosječno 4.2% stanica s kromosomskim dobitcima i 1.8% stanica s kromosomskim gubicima (transparentno žuto i plavo područje u **slici 4.4a**). Slični rezultati dobiveni su analizom 125 stanica nasumično odabranih iz 5 pokretanja stohastičkih simulacija koje je razvila kolegica mag. phys. Lucija Tomašić te iz kojih dodatno dobivamo informaciju o varijabilnosti u kromosomskim dobitcima i gubicima.

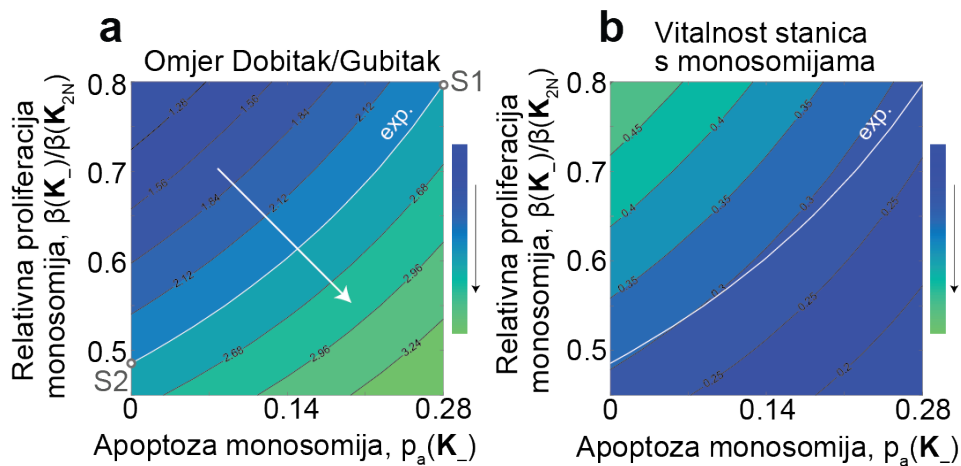


**Slika 4.4:** **a**, Postotak kromosomskih dobitaka (žuti stupci) i gubitaka (plavi stupci) izračunati stohastičkim simulacijama (stupci, srednja vrijednost za dobitak  $4.7 \pm 4.9\%$ , a za gubitak  $1.8 \pm 2.3\%$ ) i kontinuiranim „makrokariotip“ modelom (prozirno žuto i plavo područje, dobitci 4.2%, gubici 1.8%) nakon  $t = 17d$ . Kromosomski dobitci i gubici normirani su prema broju aneuploidnih stanica. **b**, Postotak kromosomskih dobitaka (žuti stupci,  $4.3 \pm 3.4\%$ ) i gubitaka (plavi stupci,  $1.8 \pm 3.3\%$ ) eksperimentalno izmjerenih u DN4 stadiju razvoja T-stanica u timusu.

Uspoređujući naše teorijske rezultate s eksperimentalno izmjerenim dobitcima i gubicima za stanice timusa u DN4 stadiju (**slika 4.4b**) nalazimo da model kvantitativno objašnjava prosječne dobitke i gubitke kromosoma dok stohastične simulacije objašnjavaju i varijabilnost ovih raspodjela („two sample Kolmogorov-Smirnov“ test, p-vrijednost je 0.5 za dobitke i gubitke kromosoma). Budući da se eksperimentalno opaženi dobitci i gubici mogu objasniti s povećanom apoptozom stanica s monosomijama, zaključujemo da omjer dobitak/gubitak može nastati zbog apoptoze ovisne o kariotipu, što podržava scenarij S1.

Da bismo istražili scenarij S2, mijenjamo stopu proliferacije u uvjetima gdje stanice ne idu u apoptozu (**slika 4.5a**, ordinata). Kako se stopa proliferacije stanica s monosomijama smanjuje, omjer dobitak/gubitak raste i za proliferaciju od  $0.48 d^{-1}$  model daje eksperimentalno opaženi omjer dobitka/gubitka od 2.4 (**slika 4.5a**, točka S2). Istraživanje

svakog procesa zasebno daje nam jasan uvid kako svaki od njih utječe na kariotip. Međutim, vjerojatnije je da stanice s monosomijama perturbirana i apoptozu i proliferaciju. Stoga mijenjamo oba parametra istovremeno, kako bismo istražili međudjelovanje scenarija S1 i S2. Nalazimo glatki prijelaz s malog na veliki omjer dobitak/gubitak kako se apoptoza povećava, a proliferacija smanjuje (**slika 4.5a**, strelica). Eksperimentalno promatrani omjer dobitak/gubitak dobiva se za kombinacije stopa apoptoze i proliferacije gdje se obje stope ili povećavaju ili smanjuju, kako bi se kompenzirao međusobni učinak (**slika 4.5b**, bijela kontura). Očekujemo da će povećana apoptoza i sporija proliferacija stanica s monosomijama smanjiti njihovu vitalnost, a vitalnost se općenito smatra sposobnošću stanice da se reproducira i definira kao  $W(\mathbf{K}) = N(\mathbf{K})^{-1} dN(\mathbf{K})/dt$ . Nalazimo da se stanice sa dobrom vitalnosti nalaze u području parametarskog prostora gdje su dobici kromosoma jednako česti kao i gubici, a stanice s lošijom vitalnosti u regiji gdje dobici dominiraju nad gubicima (usporedite **slike 4.5a i b**). Ovi rezultati navode nas na zaključak da i povećana apoptoza i sporija proliferacija stanica s monosomijama mogu objasniti eksperimentalno izmjereni omjer dobitak/gubitak, te da se međusobno kompenziraju.



**Slika 4.5:** **a**, Omjer dobitak/gubitak kromosoma (grafikon u boji, vrijednosti označene crnim linijama) za različite vrijednosti proliferacije i apoptoze monosomija. Crna strelica pored trake u boji označava rastući trend. Prijelaz s malog na visoki omjer dobitak/gubitak (od plave do zelene) označen je bijelom strelicom. Eksperimentalno izmjereni omjer dobitak/gubitak je 2.4 (bijela kontura). Bijeli krugovi označavaju parametre koji odgovaraju scenarijima S1 i S2. **b**, Vitalnost stanice (grafikon u boji, vrijednosti označene crnim linijama) za različite vrijednosti proliferacije i apoptoze monosomija. Bijela linija predstavlja konturu iz panela **a** duž koje je omjer dobitak/gubitak je jednak onom eksperimentalno izmjerenom, 2.4.

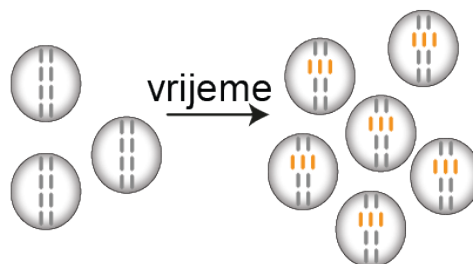
**Tablica 1:** Parametri modela.

Parametri		Vrijednost	Izvor
Proliferacija diploidnih stanica	$\beta(\mathbf{K}_{2n})$	$\ln 2 \text{ d}^{-1}$	(Petrie & Zúñiga-Pflücker, 2007)
Proliferacija stanica s krom. dobicima	$\beta(K_+)$	$0.8 \ln 2 \text{ d}^{-1}$	(Hintzen et al., 2021; Williams et al., 2008a)
Proliferacija stanica s krom. gubicima	$\beta(K_-)$	$0.8 \ln 2 \text{ d}^{-1}$	(Hintzen et al., 2021; Williams et al., 2008a)
Vjerojatnost missegregacije	$p_0$	0.0017	Izračunato iz <b>slike 4.3b</b>
Apoptoza diploidnih stanica	$p_a(\mathbf{K}_{2n})$	0	Procijenjeno
Apoptoza stanica s krom. dobicima	$p_a(K_+)$	0	Varirano ovdje
Apoptoza stanica s krom. gubicima	$p_a(K_-)$	0.28	Varirano ovdje

## 4.2 Rješenja modela za T-stanični limfom s jednim specifičnim kromosomom

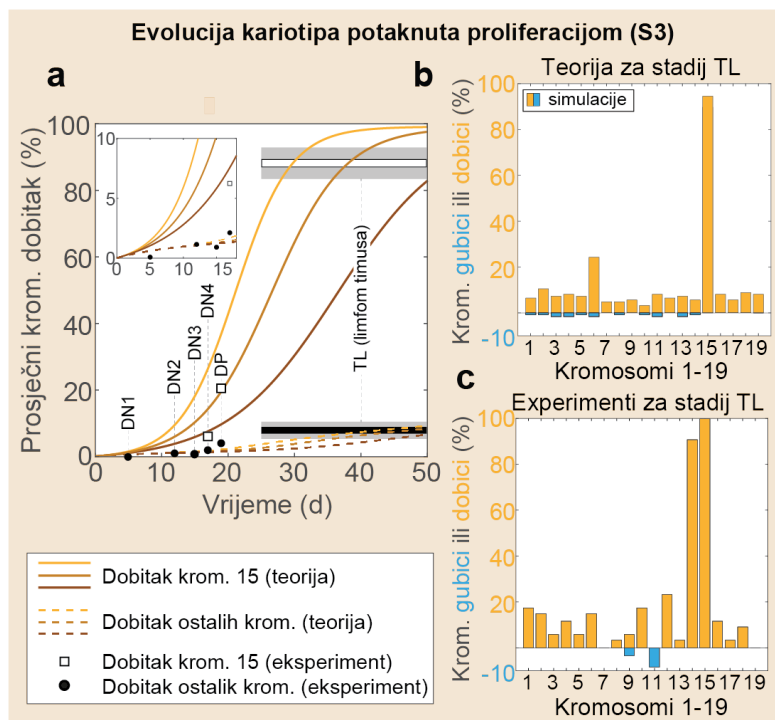
Za razliku od predtumorskih kariotipova, kod kojih nema pristranosti za dobitak bilo kojeg specifičnog kromosoma, kariotipove limfoma T-stanica karakterizira visoka pojava kromosoma 14 i 15 (Shoshani et al., 2021; Trakala et al., 2021). Kao prvi korak u razumijevanju evolucije ovog specifičnog tumorskog kariotipa, koristimo naš model za istraživanje jednostavnog slučaja u kojem se jedan kromosom, nazvan kromosom 15, pojavljuje sa znatno većim dobitkom u usporedbi s drugim kromosomima, dok u drugom korak istražujemo realističniji slučaj istodobnih dobitaka dvaju specifičnih kromosoma. Pitamo pod kojim uvjetima model reproducira eksperimentalne podatke za dobitke specifičnog kromosoma i svih ostalih kromosoma tijekom predtumorskih i tumorskih stadija (**slika 4.6**).

## Evolicija tumorskih kariotipa s jednim specifičnim kromosomom



**Slika 4.6:** Shema koje prikazuje stanice koje sadrže dvije kopije kromosoma (sivi štapići) i tri kopije određenog kromosoma (žuti štapići) u dvije različite vremenske točke.

Na način analogan teoriji za evoluciju pretumorskog kariotipa, istražujemo 2 scenarija: stanice s dobitkom kromosoma 15 imaju povećanu proliferaciju (S3) ili smanjenu apoptozu (S4) u usporedbi s drugim aneuploidnim kariotipima. Za testiranje scenarija S3, mijenjali smo brzinu proliferacije ovih stanica. Cijela evolucija ovog makrokariotipa u predtumorskim i tumorskim stadijima dobivena je rješavanjem jednadžbe (3.11) i (3.12) (**slika 4.7a**). Prva 2-3 dana povećanje kromosoma 15 i povećanje ostalih kromosoma slijedi sličan trend. Kasnije s vremenom, dobitak kromosoma 15 raste brže od povećanja ostalih kromosoma. Zapanjujuće je da je nakon 20 dana 10% – 40% stanica dobilo kromosom 15, a nakon 40 dana taj udio doseže 60% – 98%. Nasuprot tome, dobitak ostalih kromosoma je ispod 10% za sve vremenske točke.



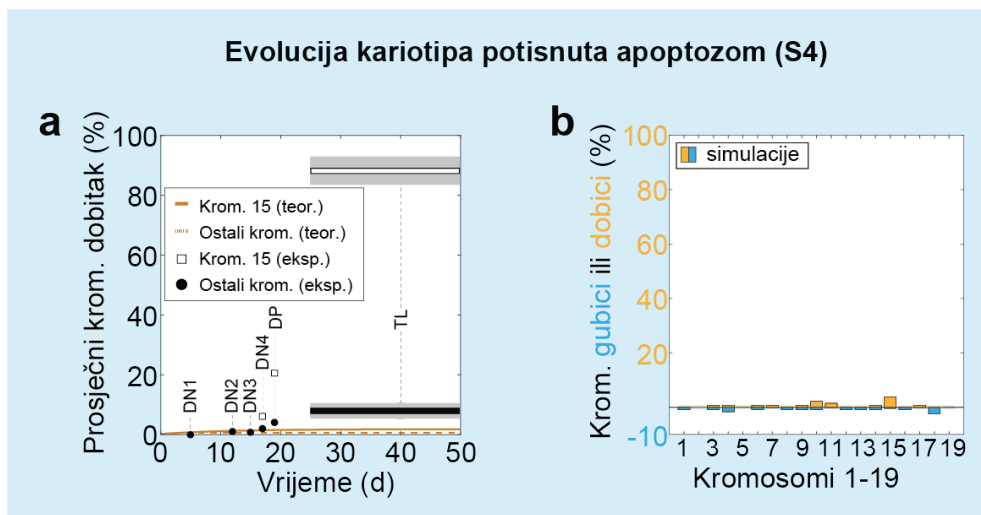
**Slika 4.7: Povećana proliferacija stanica s trisomijom kromosoma 15 pokreće evoluciju kariotipa specifičnog za tumor.** *a*, Rješenja modela srednjeg polja koja pokazuju vremensku evoluciju dobitaka kromosoma 15 (pune linije) i dobitaka ostalih kromosoma (isprekidane linije) za 3 različite stope proliferacije,  $\beta(K_{+15}) = 1.15 \text{ d}^{-1}$  (tamnonarančaste linije),  $\beta(K_{+15}) = 1.25 \text{ d}^{-1}$  (narančaste linije),  $\beta(K_{+15}) = 1.35 \text{ d}^{-1}$  (svijetlonarančaste linije). Eksperimentalno izmjereni dobici (crni krugovi) u različitim stadijima razvoja T-limfocita. U stadijima DN4, DP i TL dobitak kromosoma 15 prikazan je odvojeno (bijeli pravokutnici). Zbog eksperimentalne nesigurnosti, vrijednosti za TL stadij prikazane su za široki vremenski interval, prikazane kao dugi bijeli (kromosom 15), crni (ostali kromosomi) i sivi pravokutnici (standardna pogreška srednje vrijednosti). Umetnuta slika povećava prvih 18 dana razvoja T-stanica (DN1-DN4 faze). *b*, Postotak dobitaka (žuti stupići) i gubitaka (plavi stupići) kromosoma izračunat stohastičkim simulacijama dobivenim nakon  $t = 40 \text{ d}$ . Parametri isti kao za srednju narančastu liniju u panelu *a*. Dobitak kromosoma 15 je  $94.4\%$ , a gubitak  $0\%$ , dok je prosječni dobitak ostalih kromosoma  $7.8 \pm 4.4\%$ , a prosječni gubitak  $0.72 \pm 0.67\%$ . *c*, Postotak dobitaka kromosoma (žuti stupići) i gubitaka (plave trake) eksperimentalno izmjeren u T-limfocitima (Trakala et al., 2021). Prosječni dobitak kromosoma 14 i 15 je  $95.4 \pm 6.5\%$ , a prosječni gubitak  $0\%$ , dok je prosječni porast ostalih kromosoma  $8.7 \pm 7.1\%$ , a prosječni gubitak je  $0.7 \pm 2.1\%$ . Ostali parametri dani su u **tablici 1** osim ako nije drugačije navedeno.

Ovi teoretski rezultati su u skladu s eksperimentima, koji su pokazali da oko 90% stanica ima dobitak kromosoma 15 dok je dobitak ostalih kromosoma oko 10% (**slika 4.7a**). Ovo izraženo povećanje specifičnih kromosoma je snažan rezultat naše teorije jer se taj dobitak pojavljuje za različite proliferacije i ostaje nakon toga. Naša teorija također reproducira glavne značajke evolucije kariotipa tijekom svih faza razvoja T-stanica, uključujući polagano povećanje kromosomskih dobitaka tijekom stadija DN1-DN4 praćeno oštrijim povećanjem u

kasnijim stadijima (DP i TL stadij) (**slika 4.7a**), podržavajući ideju evolucije kariotipa potaknute proliferacijom.

Robusnost rezultata srednjeg polja usporedili smo sa stohastičkim simulacijama koje je razvila mag.phys. Lucija Tomašić koje odgovaraju realnoj situaciji s konačnim brojem stanica. Doista, stohastičke simulacije nakon 40 dana pokazale su iste trendove kao i teorija srednjeg polja, s izraženim dobitkom specifičnog kromosoma i nižim prosječnim dobitkom drugih kromosoma (usporedite **sliku 4.7a** u  $t = 40d$  i **sliku 4.7b**). U eksperimentima je utvrđeno da su limfomi T-stanica jako aneuploidni i da gotovo sve stanice sadrže dobitke kromosoma 15 (**slika 4.7c**). Usporedbom distribucija dobivenih stohastičkim simulacijama i eksperimentima, otkrivamo da su one različite za gubitke kromosoma, ali ne i za dobitke kromosoma („two sample Kolmogorov-Smirnov“ test, p-vrijednost je 0.2 za dobitke kromosoma i 0.03 za gubitke kromosoma). Slaganje eksperimenta i teorije sugerira da je povećana proliferacija stanica s povećanjem kromosoma 15 glavni razlog za povećanje specifičnih kromosoma u kariotipima tumora.

Za testiranje scenarija S4 u kojem stanice s dobitkom kromosoma 15 imaju smanjenu apoptozu, postavili smo da te stanice i euploidne stanice ne podliježu apoptozi, dok je vjerojatnost apoptoze 28% za ostale aneuploidne stanice. Za razliku od scenarija S3, koji je rezultirao izraženim dobitkom kromosoma 15 (**slika 4.7a**), nalazimo da u scenariju S4 svi dobici ostaju na niskoj vrijednosti, ispod 2% (**slika 4.8a**). Dakle, distribucija kariotipa dobivena ovim parametrima ne može reproducirati eksperimentalno opaženu visoku pojavu kromosoma 15 (**slika 4.8b**). Konkretno, iako ovaj teoretski rezultat može objasniti rane faze evolucije T-stanica, postoji velika razlika s eksperimentima za kasnije faze. Stoga zaključujemo da smanjena apoptoza stanica s dobitkom kromosoma 15 ne može objasniti eksperimentalno promatranu evoluciju kariotipa, te tako dodatno jača ideju da je ovaj proces potaknut povećanom proliferacijom tih stanica.

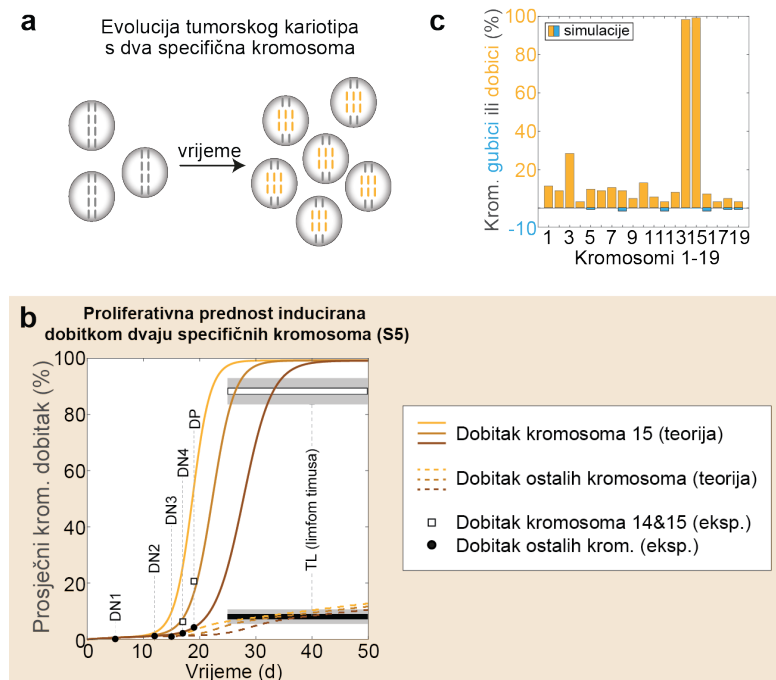


**Slika 4.8:** **a**, Rješenja modela srednjeg polja koja pokazuju vremensku evoluciju dobitka kromosoma 15 (puna linija) i dobitka ostalih kromosoma (isprekidana linija) za parametre  $p_a(K_{+15}) = 0$  i  $p_a(K \neq K_{2n}) = 0.28$ . Eksperimentalne točke su iste kao na **slici 4.7a**. **b**, Postotak dobitaka (žuti stupići) i gubitaka (plavi stupići) kromosoma izračunat stohastičkim simulacijama za parametre sa **panela a**. Ostali parametri dani su u **tablici 1** osim ako nije drugačije navedeno.

### 4.3 Rješenja modela za T-stanični limfom s dva specifična kromosoma

Kako bismo istražili slučaj istodobnih dobitaka dvaju kromosoma (**slika 4.9a**), kao što je uočeno u eksperimentima, testiramo scenarij u kojem stanice s istovremenim povećanjem oba specifična kromosoma, 14 i 15, imaju proliferativnu prednost u odnosu na sve ostale kariotipe (S5) ili scenariji u kojima ova dva kromosoma reguliraju različite procese, apoptozu (S6) ili stopu missegregacije (S7), u kombinaciji s proliferacijom. U scenariju S5, gdje je stopa proliferacije stanica s dobitcima kromosoma 14 i 15 povećana (**slika 4.9b i c**), nalazimo da tijekom prvih 10 dana svi kromosomi slijede sličan trend, dok kasnije u vremenu dobitci kromosoma 14 i 15 rastu brzo približavajući se 100%, dok dobici ostalih kromosoma ostaju oko 10%. Opći trend na **slici 4.9b** sličan je scenariju S3 gdje imamo povećanu proliferaciju za dobitke jednog specifičnom kromosoma (**slika 4.7a**), ali na **slici 4.9b** primjećujemo da se povećanje specifičnih kromosoma događa kasnije u vremenu u usporedbi sa **slikom 4.7a**. Ovaj vremenski odmak nastaje jer je manja vjerojatnost da će dogoditi dobitak dva specifična kromosoma u odnosu na samo jedan. Zanimljivo, iako smo zahtijevali da kariotipovi imaju pojačanje dva specifična kromosoma, što se čini kao strože ograničenje od povećanja samo jednog kromosoma, slaganje između pokusa i teorije dodatno se poboljšava (usporedite **slike**

**4.7a i 4.9b).** Ovi rezultati sugeriraju da pojačana proliferacija stanica s dobtkom oba specifična kromosoma može potaknuti razvoj T-staničnih limfoma.

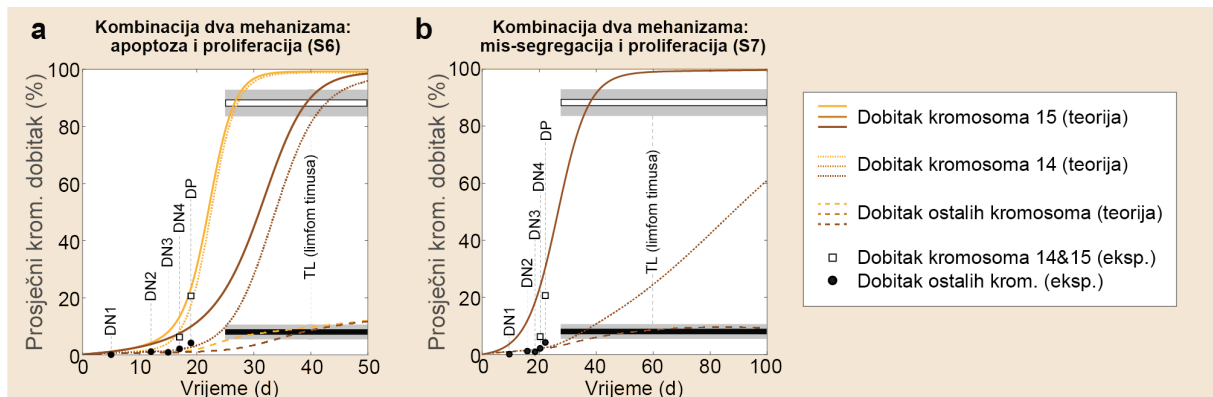


**Slika 4.9: Tumorski kariotipi s dobtkima kromosoma 14 i 15 dominiraju zbog funkcionalne ovisnosti proliferacije o kariotipu.** **a**, Shema prikazuje stanice koje sadrže dvije kopije kromosoma (sivi štapići) i tri kopije dvaju specifičnih kromosoma (žuti štapići) u dvije različite vremenske točke. **b**, Rješenja modela srednjeg polja koja pokazuju vremensku evoluciju dobttaka kromosoma 14 i 15 (pune linije) i dobttaka drugih kromosoma (isprekidane linije) za 3 različite stope proliferacije,  $\beta(K_{+14,+15}) = 1.6 \text{ d}^{-1}$  (tamnonarančaste linije),  $\beta(K_{+14,+15}) = 1.8 \text{ d}^{-1}$  (narančaste linije),  $\beta(K_{+14,+15}) = 2.0 \text{ d}^{-1}$  (svijetlonarančaste linije). **c**, Postotak dobttaka (žuti stupići) i gubitaka (plavi stupići) kromosoma izračunat stohastičkim simulacijama nakon  $t = 40 \text{ d}$  za parametre sa panela **b** (srednje linije). Stohastičke simulacije razvila je mag. phys. Lucija Tomašić. Ostali parametri dani su u **tablici 1** osim ako nije drugačije navedeno.

U scenariju S6 istražujemo slučaj u kojem stanice s dobtkom kromosoma 14 imaju smanjenu apoptozu, dok stanice s dobtkom kromosoma 15 imaju povećanu proliferaciju. Kao što se i očekivalo, povećana proliferacija kromosoma 15 dovodi do njegove brze pojave (**slika 4.10a**). Iznenađujuće, otkrivamo da se kromosom 14 također pojavljuje s visokim dobtkima te blisko prati putanju dobttaka kromosoma 15, što se dramatično razlikuje od rezultata dobivenih u S4 gdje samo smanjena apoptoza nije bila dovoljna za reprodukciju eksperimentalnih točaka na limfomu timusa. Teoretski predviđeni visoki dobttci kromosoma 14 i 15 u S6 posljedica su suradnje između povećane proliferacije i smanjene apoptoze u stanicama s dobtkom oba kromosoma. Također istražujemo može li kombinacija missegregacije i proliferacije stanica objasniti dobttke specifičnih kromosoma (S7). Doista, smanjena stopa missegregacije stanica



koje imaju dobitak kromosoma 14 povećava njihovu pojavu s vremenom (slika 4.10b). Međutim, dobitak kromosoma 14 pojavljuje se kasnije u vremenu u usporedbi s kromosomom 15 i nije u skladu s eksperimentalnim točkama u fazi DP. Stoga zaključujemo da se istovremeno povećanje dvaju specifičnih kromosoma može pojaviti i kao rezultat povećane proliferacije u kombinaciji sa smanjenom apoptozom.



**Slika 4.10: Kooperativni efekti između proliferacije i apoptoze te proliferacije i missegregacije na evoluciju kariotipa.** Rješenja modela srednjeg polja koja pokazuju vremensku evoluciju dobitaka kromosoma 14 (točkaste linije), kromosoma 15 (pune linije) i drugih kromosoma (isprekidane linije). **a**, Dvije različite vjerojatnosti apoptoze  $p_a(K_{+14}) = 0.028$  (narančaste linije) i  $p_a(K_{+14}) = 0.14$  (tamnonarančaste linije). Apoptoza drugih aneuploidnih kariotipova postavljena je na  $p_a(K \neq K_{2n}) = 0.28$ , a stopa proliferacije je  $\beta(K_{+15}) = 1.8 \text{ d}^{-1}$ . **b**, vjerojatnost missegregacije za stanice s dobitkom kromosoma 14 je  $p_0(K_{+14}) = 0.0001$ , a stopa proliferacije je  $\beta(K_{+15}) = 1.25 \text{ d}^{-1}$ . Eksperimentalne točke u panelima a i b su isti kao na slici 4.7a. Ostali parametri dani su u **tablici 1** osim ako nije drugačije navedeno.

Zaključno, naš model predviđa da se tumorski kariotipi karakterizirani velikom pojavom jednog specifičnog kromosoma mogu objasniti evolucijom aneuploidnih stanica koja je potaknuta proliferacijom. Dok u slučaju tumorskih kariotipa s dva specifična kromosoma, model predviđa da takvi kariotipi mogu nastati evolucijom koja je vođena proliferacijom koja ovisi o kariotipu ili međusobnom kooperacijom proliferacije i apoptoze. Budući da ova teorija ne može izravno identificirati ključni proces iza odabira dvaju specifičnih kromosoma, potrebna su kvantitativna mjerenja parametara za aneuploidne kariotipove. Takva mjerenja u kombinaciji s našim teoretskim predviđanjima uvelike će pomoći u razumijevanju evolucije kariotipa tumora.

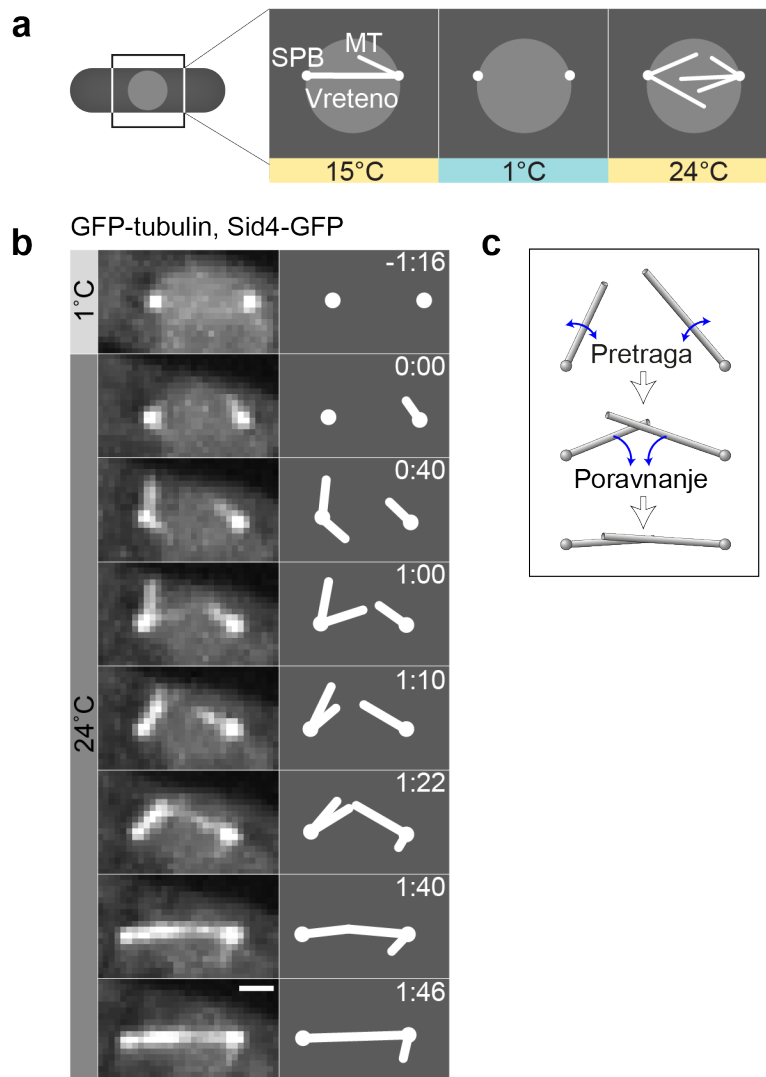
Kao što je spomenuto u uvodnom poglavlju, dioba stanica je izuzetno precizan proces koji omogućava rast i razvoj organizma. Zahvaljujući visokoj preciznosti, događaji poput missegregacije su vrlo rijetki, no usprkos tome važno ih je razumjeti jer posljedice mogu vrlo ozbiljne kao primjerice razvoj tumora. Dok je cilj ovog poglavlja bio bolje razumjeti

mehanizme razvoja specifičnih tumorskih kariotipa, jednako je važno razumjeti formiranje diobenog vretena jer je upravo to struktura koja bespriekorno radi kako ne bi došlo do missegregacije ili drugih grešaka u diobi. Stoga, fokus sljedeća dva poglavlja je upravo razumjeti mehanizme formiranja diobenog vretena.

## 5 Formiranje diobenog vretena kvasca

Dok su već formirani antiparalelni svežnjevi u metafazi u velikoj mjeri opisani, malo se zna o tome kako se ove visoko organizirane strukture formiraju na početku diobe. Razlog je taj što ovaj dinamički proces nije dostupan trenutnim eksperimentalnim tehnikama zbog velikog broja mikrotubula koji se protežu iz polova vretena u višim eukariotskim stanicama (Yamashita et al., 2018), koji mogu tvoriti antiparalelne svežnjeve. U stanicama kvasca, koje imaju mali broj mikrotubula i štapićasto vreteno (Ding et al., 1993; Winey et al., 1995), proučavanje formiranja antiparalelnih svežnjeva u živim stanicama izazovno je jer su polovi vretena jedan pored drugoga na početku diobe. Ipak, prednost kvasaca kao eksperimentalnih sustava je u tome što se njihova vretena sastoje od samo jednog antiparalelnog snopa.

Na početku mitoze u kvascu *Schizosaccharomyces pombe*, dva pola diobenog vretena ugniježđena su u jezgrinu ovojnicu, koja se ne raspada tijekom mitoze (McCully & Robinow, 1971). Polovi diobenog vretena nukleiraju polarne mikrotubule s minus krajevima na polu i plus krajevima u nukleoplazmi (Ding et al., 1993; Sagolla et al., 2003). Mikrotubuli koji se protežu iz suprotnih polova međusobno interagiraju i tvore antiparalelni interpolarni svežanj, te zajedno s mikrotubulima koji se vežu na kinetohore sastavljaju vreteno. Interakcije između antiparalelnih mikrotubula događaju se kada su polovi vretena jedan pokraj drugog (Ding et al., 1997), što otežava proučavanje dinamike ovog procesa. Kako bi povećali udaljenost između polova, naši suradnici osmislili su protokol u kojem se stanice u metafazi (kada diobeno vreteno poprima svoj ravnotežni oblik) izlože niskoj temperaturi (1°C) pri čemu se diobeno vreteno raspada, a polovi diobenog vretena ostaju razmaknuti (**slika 5.1a**). Kada je temperatura povećana na sobnu temperaturu (24°C), polovi su ostali udaljeni za duljinu metafaznog vretena. Stoga, ovaj test je omogućio našim suradnicima da eksperimentalno istraže proces formiranja antiparalelnog svežnja u kvascima.

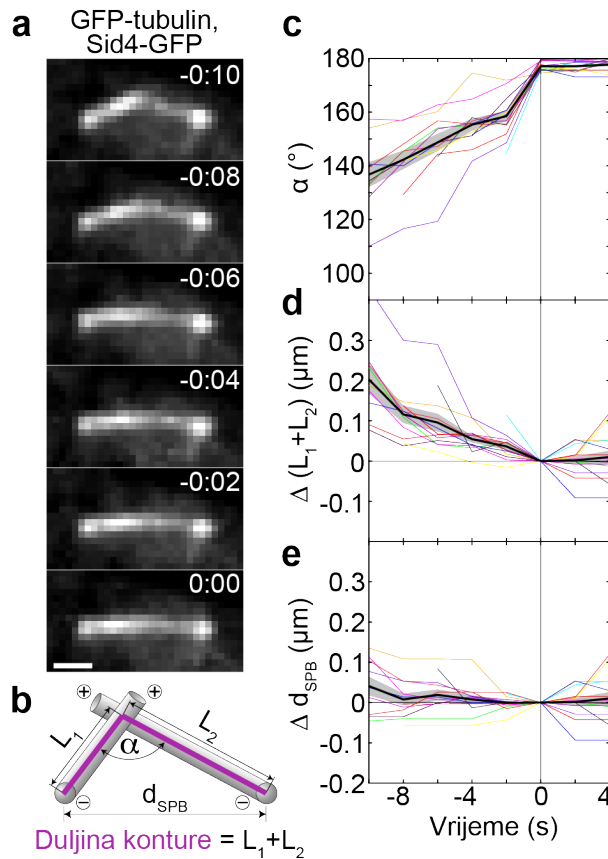


**Slika 5.1: Eksperimentalna observacija formiranja vretena u kvascu.** **a**, Eksperimentalni protokol za observaciju formacije vretena u kvascu. Nakon što se diobeno vreteno formiralo i kao posljedica toga polovi diobenog vretena (engl. „spindle pole bodies“, SPB) su se razdvojili na udaljenost diobenog vretena, mitotičke stanice ohlađene su na 1°C kako bi se mikrotubuli (MT) depolimerizirali. Nakon što se temperatura povećala na 24°C, mikrotubuli su ponovo počeli rasti iz polova i u konačnici ponovo formirali diobeno vreteno. **b**, Slike vremenskih isječaka ponovnog sastavljanja vretena u stanicama kojima su označeni polovi diobenog vretena i mikrotubula. Vrijeme je dato u min:s, skala, 1 μm. Odgovarajuće sheme prikazane su desno. **c**, Shema koja pokazuje formiranje antiparalelnog svežnja mikrotubula u dva koraka. Polovi su predstavljeni kao kugle, a mikrotubuli kao štapići.

Nakon završetka hladnog tretmana i vraćanja stanica na sobnu temperaturu, mikrotubuli su počeli rasti iz svakog od dva pola diobenog vretena (definirano kao vrijeme 0, **slika 5.1b**). Mikrotubuli nisu rasli u definiranom smjeru, nego su se nasumično rotirali oko polova (**slika 5.1b**, 0:00-1:22), što je u skladu s prethodnim opažanjima dinamike mikrotubula (Kalinina et al., 2012). Na kraju je mikrotubul koji se proteže iz jednog pola došao u kontakt s mikrotubulom iz drugog pola (**slika 5.1b**, 1:22). U vrijeme početnog kontakta, mikrotubuli obično nisu bili poravnati na antiparalelnu konfiguraciju, već su međusobno interagirali pod nekim kutom

(slika 5.1b, 1:22). Nakon početnog kontakta, mikrotubuli su se zarotirali u antiparalelno poravnanje (slika 5.1b, 1:22-1:46). Ova eksperimentalna opažanja možemo sažeti sljedeća dva koraka: (i) rast mikrotubula i nasumična rotacija prije njihovog kontakta, što nazivamo pretraživanjem, i (ii) usmjerena rotacija mikrotubula prema antiparalelnoj konfiguraciji, koju nazivamo poravnanjem (slika 5.1c).

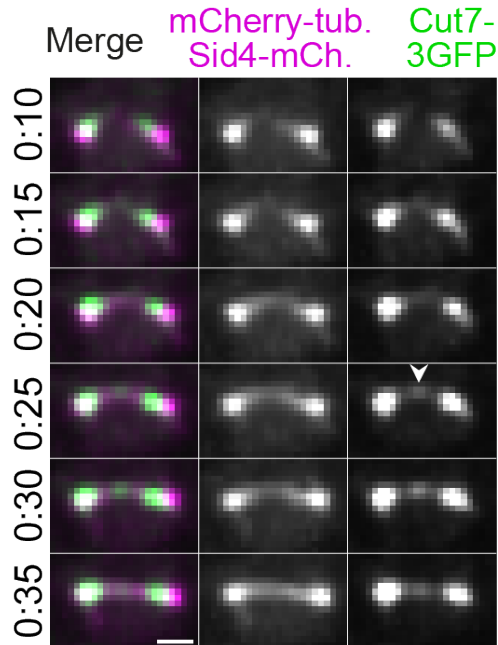
Tijekom poravnanja, svežnjevi mikrotubula rotiraju se u antiparalelnu konfiguraciju klizeći bočno jedan duž drugog prema polovima diobenog vretena (slika 5.2a). Kako bismo kvantificirali geometriju ovog sustava u vremenu definiramo duljinu konture kao segmentirana linija koja počinje na jednom polu diobenog vretena, prolazi kroz kontaktnu točku između mikrotubula i završava na drugom polu (slika 5.2b). Mjerenjem kuta između mikrotubula,  $\alpha$  (slika 5.2c), otkrili smo da se kut povećao prema 180 stupnjeva, što predstavlja antiparalelnu konfiguraciju, dok sljedeće 4 sekunde ostaje konstantan (slika 5.2c). Rotacijom mikrotubula prema 180 stupnjeva kontura se smanjuje, a onda također poprima konstantnu vrijednost (slika 5.2d). Duljina konture smanjivala se linearno, što nam je omogućilo da uvedemo mjeru nazvanu konturna brzina, definirana kao brzina kojom se duljina konture mijenja. Izmjerali smo konturnu brzinu od  $-18 \pm 2$  nm/s ( $n=14$  stanica). Za razliku od duljine konture, udaljenost između SPB-ova bila je konstantna i tijekom poravnanja i nakon njega (slika 5.2e). Ovi eksperimentalni rezultati otkrivaju da se tijekom uspostavljanja kontaktne točke između mikrotubula, ona pomiče usmjereno prema minus kraju svakog mikrotubula, koji se nalazi polu. Što znači da se poravnanje može pokretati motorima usmjerenim prema minus kraju. Brzina kojom motori pomiču mikrotubul jedan u odnosu na drugi jednaka je brzini promjene duljine konture.



**Slika 5.2: Bočno klizanje mikrotubula tijekom poravnanja.** **a**, vremenski isječci 10s prije formiranja diobenog vretena stanica kojima su označeni polovi i mikrotubuli (sivo). Vrijeme je dato u min:s, skala, 1  $\mu\text{m}$ . **b**, mjerenje kuta između mikrotubula,  $\alpha$ , duljine konture,  $L_1 + L_2$ , i udaljenosti između polova,  $d_{\text{SPB}}$ , tijekom formiranja antiparalelnog svežnja. Polovi su predstavljeni kao kugle, a mikrotubuli kao štapići; Znakovi plus i minus označavaju odgovarajuće krajeve mikrotubula. **c**, Kut između mikrotubula,  $\alpha$ , kao funkcija vremena. **d**, Razlika duljine konture kao funkcija vremena. Razlika duljine konture definirana je kao razlika između duljine konture,  $L_1 + L_2$ , u određenom trenutku i duljine konture u  $t = 0$ ,  $\Delta(L_1 + L_2) = L_1 + L_2 - (L_1 + L_2)|_{t=0}$ . **e**, Razlika udaljenosti između polova kao funkcija vremena, definirana kao razlika između udaljenosti polova,  $d_{\text{SPB}}$ , u danom trenutku i udaljenosti u  $t = 0$ ,  $\Delta d_{\text{SPB}} = d_{\text{SPB}} - d_{\text{SPB}}|_{t=0}$ .

Kako bismo istražili lokalizaciju motornih proteina, a time i potencijalna mjesta na kojima mogu djelovati sile koje usklađuju mikrotubule iz suprotnih polova u antiparalelnu konfiguraciju, koristili smo stanice u kojima zelenom bojom označeni motorni protein Cut7 (kojeg karakterizira kretanje prema minus kraju), a ljubičastom bojom mikrotubuli. Na **slici 5.3** možemo vidjeti da se tijekom formiranja diobenog vretena većina motora nakuplja blizu polova diobenog vretena. No vrlo je zanimljivo je da je signal motornog proteina Cut7 također pronađen na mjestu gdje su mikrotubuli koji se protežu iz dva pola uspostavili kontakt (strelica na **slici 5.3**). Motorni proteini, kao glavni generatori sila u diobnom vretenu dobar su kandidat za pokretanje procesa formiranja diobenog vretena. Motorni proteini Cut7 koji se nakupljaju na polovima diobenog vretena ne mogu doprinosti poravnanju mikrotubula u antiparalelnu

konfiguraciju budući da su u području oko polova svi mikrotubuli orijentirani u istom smjeru (odnosno čine paralelne svežnjeve). Stoga pretpostavljamo da Cut7 pronađen na mjestu interakcije mikrotubula može djelovati silama koje poravnavaju mikrotubule u antiparalelnu konfiguraciju.

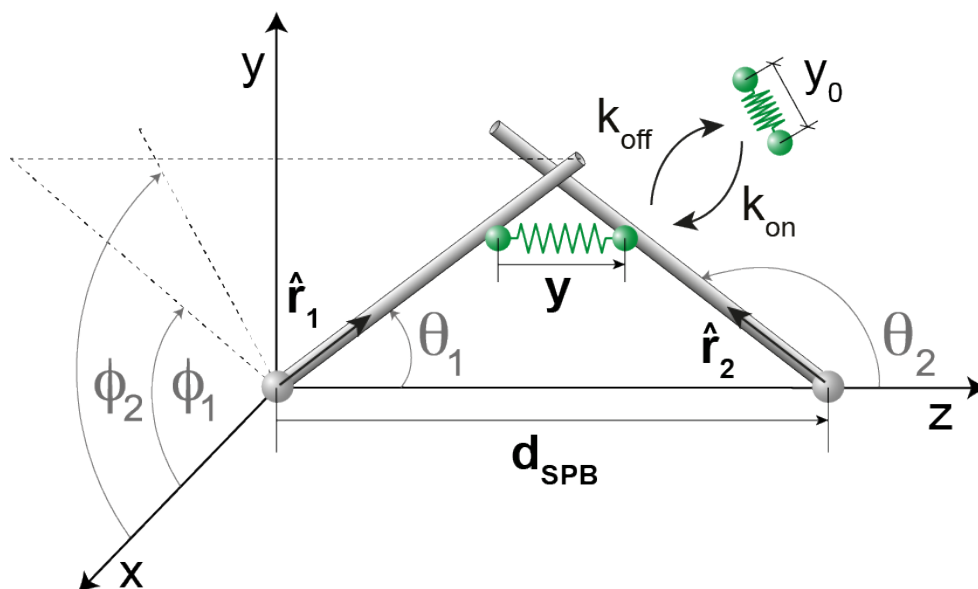


**Slika 5.3: Motorni protein kinezin-5 (Cut7) opažen je na mjestu kontakta mikrotubula.** Opažanje formiranja vretena u stanicama kojima su ljubičastom bojom označeni mikrotubuli, a zelenom bojom motorni protein Cut7. U prvom stupcu prikazana su oba signala (i mikrotubuli i motorni proteini). Bijela boja u tom stupcu predstavlja preklapanje signala mikrotubula i motora (preklapanje ljubičastog i zelenog signala). Srednji stupac prikazuje samo signal mikrotubula, a desni stupac prikazuje signal motornih proteina. Strelica u desnom stupcu označava nakupljanje motornog proteina Cut7 na mjestu kontakta mikrotubula.

## 6 Teorijski opis formiranja diobenog vretena

### 6.1 Model za formiranje antiparalelnih svežnjeva

Da bismo istražili kako mikrotubuli, koji se inicijalno protežu u proizvoljnim smjerovima, postaju poravnati u antiparalelni svežanj koji povezuje polove vretena, uvodimo jednostavan fizikalni model (slika 6.1). Glavna ideja našeg teorijskog pristupa je da mikrotubuli izvode rotacijsko kretanje oko pola vretena, koje im omogućuje pretraživanje prostora i omogućuje da dođu blizu mikrotubula koji se protežu iz suprotnog pola kako bi u konačnici uspostavili konfiguraciju potrebnu za sklapanje vretena. U našem modelu, dvije vrste sila pokreću rotacijsko kretanje mikrotubula: sile koje stvaraju motorni proteini i termalne sile. Sile koje generiraju motori pojavljuju se kada mikrotubuli dođu međusobno jako blizu što omogućuje motorima da se pričvrste u toj regiji i tako povežu mikrotubule. U našem modelu, motori se pričvršćuju istovremeno s oba kraja na dva mikrotubula koji se protežu iz suprotnih polova vretena (slika 6.1). Motor je opisan kao elastična opruga čija se dva kraja mogu kretati duž dva mikrotubula. Motor se kreću prema minus kraju mikrotubula, koji se nalazi na polu vretena, stvarajući usmjerenu silu na mikrotubule koja ih rotira prema osi polova. Motor se smatra generatorom sile čija se brzina smanjuje pod opterećenjem. Za razliku od usmjerenih sila motornih proteina, termalne sile su nasumične i uvijek prisutne bez obzira na udaljenost između mikrotubula. Detaljniji opis geometrije modela te samih jednadžbi dani su u sljedećim odjeljcima.



**Slika 6.1: Shema modela.** Svaki mikrotubul (sivi štap) je zglobovno vezan za odgovarajući pol diobenog vretena (siva kugla). Orijentacije mikrotubula predstavljene su jediničnim vektorima  $\hat{r}_1$  i  $\hat{r}_2$ , dok su polovi u fiksnim točkama odvojeni udaljenošću  $d_{SPB}$ . Motorni proteini (zelene opruge) mogu se vezati



*i odvezivati s mikrotubula stopama  $k_{\text{on}}$  i  $k_{\text{off}}$ , a kada su pričvršćeni, njihovo istegnuće je  $y$ . U Kartezijevim koordinatama polovi su u točkama  $(0,0,0)$  i  $(0,0,d_{\text{SPB}})$ . Orijentacije mikrotubula opisane su polarnim kutovima  $\theta_1$  i  $\theta_2$  te azimutalnim kutovima  $\phi_1$  i  $\phi_2$  za prvi i drugi mikrotubul..*

### 6.1.1 Orijentacija mikrotubula

Mikrotubule modeliramo kao dva tanka, rigidna štapa konstantnih duljina  $R_1$  i  $R_2$  (ovdje i u ostatku teksta indeksi 1 i 2 predstavljaju prvi i drugi mikrotubul), koji su zglobovno vezani za pripadni pol diobenog vretena (engl. „spindle pole body“, SPB). Orijentacije mikrotubula označavamo jediničnim vektorima  $\hat{\mathbf{r}}_{1,2}$ , a polovi su smješteni u ishodište i u  $\mathbf{d}_{\text{SPB}} = d_{\text{SPB}}\hat{\mathbf{z}}$ , gdje je  $\hat{\mathbf{z}}$  jedinični vektor u smjeru Kartezijeve z-koordinate. Mikrotubuli pivotiraju (vrše nasumično kutno gibanje) oko pripadnog pola s kutnim brzinama  $\boldsymbol{\omega}_{1,2}$ . Orijentacije mikrotubula mijenjaju se u vremenu,  $t$ , kao

$$\frac{d\hat{\mathbf{r}}_{1,2}}{dt} = \boldsymbol{\omega}_{1,2} \times \hat{\mathbf{r}}_{1,2}. \quad (6.1)$$

U režimu jakog gušenja, kutno trenje mikrotubula uravnoteženo je ukupnim momentom sile,

$$\gamma_{1,2}\boldsymbol{\omega}_{1,2} = \mathbf{T}_{1,2}, \quad (6.2)$$

gdje je  $\gamma_{1,2}$  kutni koeficijent trenja mikrotubula. Ukupni moment sile ima dva doprinosa,  $\mathbf{T}_{1,2} = \boldsymbol{\tau}_{1,2} + \sigma_{1,2}[\hat{\mathbf{r}}_{1,2} \times \boldsymbol{\eta}_{1,2}(t)]$ , prvi član je deterministički moment sile,  $\boldsymbol{\tau}_{1,2}$ , koji je uzrokovan silama kojima motorni proteini djeluju na mikrotubule kad se s obje glave zakače na njih, a drugi član je stohastički član koji opisuje šum. U našem modelu, šum je termalan, te se njegov intenzitet računa iz ekviparticijskog teorema kao  $\sigma_{1,2} = \sqrt{2k_B T \gamma_{1,2}}$ , gdje je  $k_B T$  umnožak Boltzmannove konstante i temperature. 3-dimenzionalni nasumični vektor  $\boldsymbol{\eta}_{1,2}$  ima komponente koje su Gaussovski raspodijeljene sa srednjom vrijednosti nula i jediničnom varijancom. Šum je nekoreliran u vremenu i njegove komponente su međusobno neovisne  $\langle \eta_i(t), \eta_j(t') \rangle = \delta(t - t')\delta_{ij}$ , gdje je  $\delta(t - t')$  Diracova delta funkcija i  $\delta_{ij}$  je Kronecker delta funkcija. Koristeći ove definicije i jednadžbu (6.2), dobivamo jednadžbe za kutne brzine mikrotubula,

$$\boldsymbol{\omega}_{1,2} = D_{1,2} \frac{\boldsymbol{\tau}_{1,2}}{k_B T} + \sqrt{2D_{1,2}}[\hat{\mathbf{r}}_{1,2} \times \boldsymbol{\eta}_{1,2}(t)], \quad (6.3)$$

gdje je  $D_{1,2} = k_B T / \gamma_{1,2}$  kutni difuzijski koeficijent mikrotubula.

## 6.1.2 Sile, momenti sila i brzina vezivnih proteina

Momenti sila u jednadžbi (6.3) ovise o distribucijama vezivnih proteina na mikrotubulima u danom vremenu,  $\boldsymbol{\tau}_{1,2} = \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_{1,2;i} \times \mathbf{f}_{1,2;i}$ . Indeksi  $i = \{1, \dots, N\}$  odnose se na vezujuće proteine koji su spojeni na oba mikrotubula.

Vezivni protein koji je spojen na mikrotubule modeliramo kao Hookeovu opruga duljine  $y_0$  u opuštenom stanju i krajevima zakačenim na pozicijama  $\mathbf{r}_{1,2;i} = r_{1,2;i} \hat{\mathbf{r}}_{1,2}$  u odnosu na referentni pol diobenog vretena, gdje je  $r_{1,2;i}$  pozicija uzduž mikrotubula. Vektor koji opisuje istegnuće vezivnih proteina je  $\mathbf{y}_i = \mathbf{r}_{2,i} + \mathbf{d}_{\text{SPB}} - \mathbf{r}_{1,i}$  a elastična sila koju vezivni protein vrši na mikrotubula je

$$\mathbf{f}_{1,2;i} = \pm k \mathbf{y}_i \left( 1 - \frac{y_0}{|\mathbf{y}_i|} \right), \quad (6.4)$$

gdje  $k$  označava konstantu opruge.

Ovako uveden model je generalan i odnosi se na sve tipove vezivnih proteina, uključujući motorne i pasivne vezivne proteine. No, brzina vezivnih proteina ruž mikrotubula ovisi o tome je li kretanje vezivnih proteina aktivan proces, kao u slučaju motornih proteina ili je termalan kao u slučaju pasivnih vezivnih proteina. U slučaju motornih proteina, njihova brzina duž mikrotubula dana je izrazom

$$v_{1,2;i}(t) = v_0 \left[ 1 - \frac{\mathbf{f}_{1,2;i} \cdot \hat{\mathbf{r}}_{1,2;i}}{f_0} \right] + \sqrt{2D_c} \eta_{1,2;i}(t), \quad (6.5)$$

gdje je prvi, deterministički, član brzina motornih proteina opisana linearnom ovisnosti sile i brzine dok drugi, stohastički, član opisuje fluktuacije brzina. Brzina glave motornog proteina kad nema opterećenja je  $v_0$ , zaustavna sila je  $f_0$ , a varijanca fluktuacija brzina je  $D_c$ . S druge strane, u slučaju pasivnih vezivnih proteina, brzina njihovog gibanja duž mikrotubula dana je sa

$$v_{1,2;i}(t) = -\frac{D_c}{k_B T} \mathbf{f}_{1,2;i} \cdot \hat{\mathbf{r}}_{1,2;i} + \sqrt{2D_c} \eta_{1,2;i}(t). \quad (6.6)$$

Možemo uočiti da i koeficijent trenja  $D_c/k_B T$  u prvom članu i intenzitet šuma  $\sqrt{2D_c}$  u drugom članu ovise o konstanti difuzije pasivnih vezivnih proteina,  $D_c$ , prema fluktuacijsko-disipacijskom teoremu.

### 6.1.3 Modeliranje vezanja i odvezivanja vezivnih proteina

Vezivni proteini mogu se vezati i odvezivati s mikrotubula i tako se ukupni broj proteina vezanih na mikrotubule,  $N(t)$ , mijenja u vremenu. U svakom malom vremenskom intervalu  $\Delta t$ , novi vezivni protein može se vezati na oba mikrotubula s vjerojatnošću  $k_{\text{on}}N_0\Delta t$  gdje je  $N_0(\mathbf{y})$  efektivni broj vezivnih proteina u nukleoplazmi koji uzima u obzir energiju vezanja svakog proteina. Također, već pričvršćeni vezivni protein može se odvojiti s vjerojatnošću  $k_{\text{off}}N\Delta t$ . Konstante  $k_{\text{on}}$  i  $k_{\text{off}}$  su stope vezanja i odvezivanja. Važno je napomenuti da se indeksi vezivnih proteina  $i = \{1, \dots, N\}$  moraju mijenjati sukladno događajima vezanja i odvezivanja motornih proteina.

### 6.1.4 Rješenja modela

Da bismo dobili promjenu orijentacije mikrotubula u vremenu, parametriziramo vektor orijentacije mikrotubula koji je dan jediničnim vektorom  $\hat{\mathbf{r}}_{1,2}(\theta_{1,2}, \phi_{1,2}) = (\sin \theta_{1,2} \cos \phi_{1,2}, \sin \theta_{1,2} \sin \phi_{1,2}, \cos \theta_{1,2})$  gdje  $\theta_{1,2}$  i  $\phi_{1,2}$  označavaju polarni i azimutalni kut. U ovoj parametrizaciji, jednačba (6.3) daje jednačbe gibanja za kutove,

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \theta_{1,2} \\ \phi_{1,2} \end{bmatrix} = \frac{D}{k_{\text{B}}T} \left( \sum_{i=1}^N r_{1,2;i} \mathbf{F}_{1,2;i} \right) \circ \mathbf{a}_{1,2} + D \begin{bmatrix} \cot \theta_{1,2} \\ 0 \end{bmatrix} + \sqrt{2D_{1,2}} \begin{bmatrix} \eta_{\theta;1,2} \\ \csc \theta_{1,2} \eta_{\phi;1,2} \end{bmatrix}, \quad (6.7)$$

gdje  $\circ$  predstavlja Hadamard-Schurov produkt. Zbog jednostavnosti zapisa, uveli smo notaciju za član koji ovisi o poziciji vezivnih proteina i ima dimenziju sile,

$$\mathbf{F}_{1,2;i} \equiv k \begin{bmatrix} (r_{2,1;i} - L_{2,1}) \\ r_{2,1;i} \end{bmatrix} \left( 1 - \frac{y_0}{y_i} \right), \quad (6.8)$$

i za član koji ovisi samo o kutovima,

$$\mathbf{a}_{1,2} \equiv \begin{bmatrix} (\sin \theta_{2,1} \cos \theta_{1,2} \cos(\phi_{1,2} - \phi_{2,1}) - \cos \theta_{2,1} \sin \theta_{1,2}) \\ \sin \theta_{2,1} \sin(\phi_{2,1} - \phi_{1,2}) \end{bmatrix}. \quad (6.9)$$

U jednačbi (6.8)  $L_{2,1}$  označava točku na mikrotubulima u kojoj je njihova međusobna udaljenost najmanja. Budući da se gornja granica sumacije u jednačbi (6.7) mijenja nakon

događaja vezanja ili odvezivanja motora s mikrotubula, korisno je izraziti ju preko prosječnih vrijednosti,

$$\sum_{i=1}^N r_{1,2;i} \mathbf{F}_{1,2;i} = N\bar{r}\bar{\mathbf{F}}_{1,2} + \sum_{i=1}^N (r_i - \bar{r})(\mathbf{F}_{1,2;i} - \bar{\mathbf{F}}_{1,2}), \quad (6.10)$$

gdje su  $\bar{r}_{1,2} \equiv \sum_{i=1}^N r_{1,2;i}/N$  i  $\bar{\mathbf{F}}_{1,2} \equiv \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_{1,2;i}/N$ . Kako bismo izračunali  $\bar{\mathbf{F}}_{1,2}$  koristimo dvije pretpostavke: prva, da su produljenja vezivnih proteina usporediva s njihovom prirodnom duljinom,  $y_i \approx y_0$ ; druga, da su jedinični vektori istegnuća vezivnih proteina,  $\hat{\mathbf{y}}_i$ , nasumično usmjereni poštivajući izotropnu distribuciju. Ove aproksimacije omogućavaju nam da izrazimo srednje vrijednosti u jednadžbi (6.8) preko srednjih vrijednosti za položaje vezivnih proteina,

$$\bar{\mathbf{F}}_{1,2} = \frac{k}{2} \begin{bmatrix} (\bar{r}_{2,1} - L_{2,1}) \\ \bar{r}_{2,1} \end{bmatrix}. \quad (6.11)$$

U konačnici, drugi član u jednadžbi (6.10) možemo izraziti koristeći spomenute aproksimacije i rezultate iz (Prelogović et al., 2019)

$$\sum_{i=1}^N (r_i - \bar{r})(\mathbf{F}_{1,2;i} - \bar{\mathbf{F}}_{1,2}) = \frac{1}{2\pi^2} \left( 1 + \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{k y_0^2}} \right) \left( \frac{1}{\sin \frac{\alpha}{2}} - \frac{1}{\cos \frac{\alpha}{2}} \right) \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix}, \quad (6.12)$$

gdje  $\alpha$  označava kut između mikrotubula. Ovaj član je zanemariv u slučaju motornih proteina zato što opisuje fluktuacije oko ravnotežnog položaja, a to je značajno samo u slučaju pasivnih proteina koji nemaju preferirani smjer kretanja. Ovdje opisani pristup omogućuje nam da izrazimo momente sila preko usrednjenih položaja vezivnih proteina i njihovog ukupnog broja koji su zakačeni za oba mikrotubula umjesto preko pozicija i stanja svakog pojedinačnog vezivnog proteina. Kako bismo riješili jednadžbe za gibanje mikrotubula, moramo također dobiti diferencijalne jednadžbe za položaj vezivnih proteina i broj njih koji su vezani za oba mikrotubula.

U granici kada imamo veliki broj vezivnih proteina u nukleoplazmi,  $N_0$ , vjerojatnost da će  $N$  vezivnih proteina biti spojeno na oba mikrotubula,  $p_N$  računa se preko Master jednadžbe,

$$\frac{dp_N}{dt} = k_{\text{on}} N_0 p_{N-1} + k_{\text{off}} (N+1) p_{N+1} - (k_{\text{on}} N_0 + k_{\text{off}} N) p_N. \quad (6.13)$$

Za  $N \gg 1$ ,  $N(t)$  možemo smatrati kontinuiranom varijablom i jednadžba (6.13) se može aproksimirati s Langevinovom jednadžbom za broj motora,

$$\frac{dN}{dt} = k_{\text{on}} N_0 - k_{\text{off}} N + \sqrt{k_{\text{on}} N_0 + k_{\text{off}} N} \eta_N. \quad (6.14)$$

Ova jednadžba izvedena je tako što smo izračunali očekivanu vrijednost vezivnih proteina,  $E[N] = \sum_{N=0}^{\infty} N p_N$  te njihovu varijancu,  $\text{var}(N) = \sum_{N=0}^{\infty} N^2 p_N - (E[N])^2$  iz jednadžbe (6.13). Efektivni broj vezivnih proteina u nukleoplazmi može se aproksimirati izrazom

$$k_{\text{on}} N_0 = \frac{c_0}{\sin \alpha} e^{-\frac{y_{\text{min}}^2}{y_0^2}}, \quad (6.15)$$

gdje konstanta  $c_0$  označava koncentraciju vezivnih proteina, a  $y_{\text{min}} = y(L_1, L_2)$  predstavlja minimalnu udaljenost između mikrotubula.

Osim kretanja vezivnih proteina duž mikrotubula, njihovo vezanje i odvezivanje utječu na prosječne koordinate vezivnih proteina. Ovdje je prikladno uvesti pomoćne koordinate  $\bar{u} = (\bar{r}_1 + \bar{r}_2)/2$  i  $\bar{w} = (\bar{r}_1 - \bar{r}_2)/2$  jer su brzine vezivnih proteina duž ovih koordinata međusobno neovisne. Uvrštavanjem jednadžbe (6.6) i korištenjem definicije za srednju vrijednost dobivamo sustav nezavisnih jednadžbi

$$\begin{aligned} \frac{d\bar{u}}{dt} = v_{\bar{u}} - k_{\text{on}} N_0 \frac{\bar{u} - L_u}{N + 1} + \sqrt{\frac{k_{\text{on}} N_0}{(N + 1)^2} \left( (\bar{u} - L_u)^2 + \frac{k_B T}{4k \sin^2 \frac{\alpha}{2}} \right)} \eta_{u;a} \\ + \frac{\sigma_u}{|N - 1|} \eta_{u;d}, \end{aligned} \quad (6.16a)$$

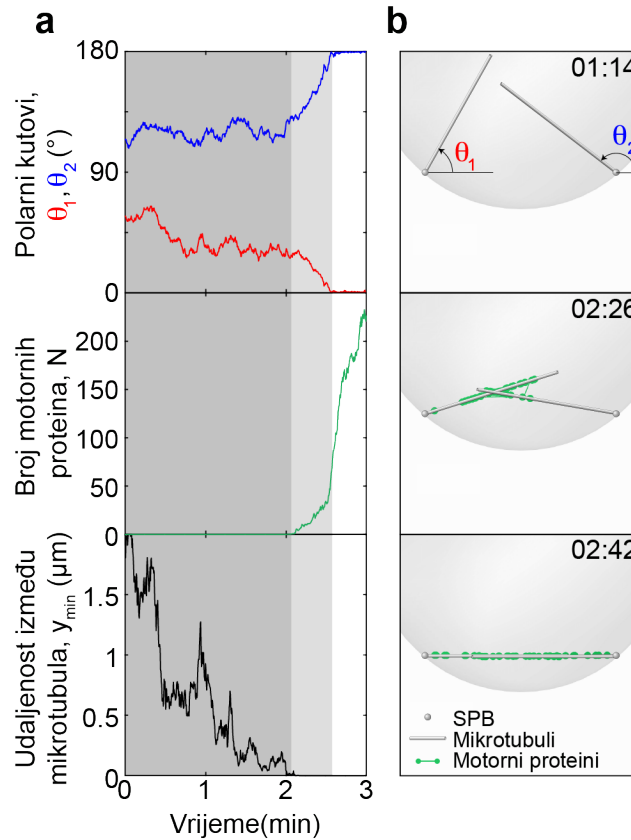
$$\begin{aligned} \frac{d\bar{w}}{dt} = v_{\bar{w}} - k_{\text{on}} N_0 \frac{\bar{w} - L_w}{N + 1} + \sqrt{\frac{k_{\text{on}} N_0}{(N + 1)^2} \left( (\bar{w} - L_w)^2 + \frac{k_B T}{4k \cos^2 \frac{\alpha}{2}} \right)} \eta_{w;a} \\ + \frac{\sigma_w}{|N - 1|} \eta_{w;d}, \end{aligned} \quad (6.16b)$$

gdje je  $L_{u,w} = (L_1 \pm L_2)/2$  i  $v_{\bar{u},\bar{w}} = \sum_{i=1}^N (v_{1,i} \pm v_{2,i})/2N$  su brzine dobivene iz jednadžbi (6.5) i (6.6) za motore i pasivne proteine. Usrednjena projekcija sile  $\sum_{i=1}^N \mathbf{f}_{1,2;i} \cdot \hat{\mathbf{r}}_{1,2;i}$  izračunata je na isti način kao jednadžba (6.11). Članovi  $\sigma_{u,w}$  označavaju standardnu devijaciju stacionarnih distribucija za koordinate dobivene iz jednadžbi (6.5) i (6.6) za motore i pasivne vezivne proteine.

Koristeći usrednjene koordinate dane u jednadžbama (6.16a,b) i broj vezanih proteina dan jednadžbom (6.13), računamo komponente momenta sile iz jednadžbe (6.7) koji određuju orijentacije mikrotubula.

## 6.2 Predikcije modela i usporedba s eksperimentima

Numeričkim rješavanjem modela dobili smo kako se putanje mikrotubula i broj vezanih proteina mijenja u vremenu. Ako krenemo iz proizvoljnog početnog kuta, rješenja modela pokazuju da mikrotubuli prvotno vrše nasumično kutno gibanje (**slika 6.2a**, vrh). Ovo kretanje mikrotubula posljedica je djelovanja termalnih sila, budući da na njih nisu pričvršćeni motori (**slika 6.2a**, sredina) jer mikrotubuli još nisu u kontaktu (**slika 6.2a**, dolje). Nasumično kretanje završava kada se mikrotubuli dovoljno približe jedan drugome tako da se motori mogu spojiti na njih (**slika 6.2a**, dolje). Nakon toga se polarni kutovi mikrotubula mijenjaju usmjerenom prema antiparalelnoj konfiguraciji (svijetlosivo područje na **slici 6.2a**, gore). Ovo usmjerenom kretanje rezultat je nakupljanja motora koji stvaraju sile (**slika 6.2a**, sredina). Kretanje se zaustavlja kada se polarni kutovi približe  $0^\circ$  za prvi i  $180^\circ$  za drugi mikrotubul (**slika 6.2a**, gore), tvoreći tako stabilan antiparalelni svežanj. Ovo usmjerenom kretanje mikrotubula koje je popraćeno akumulacijom vezivnih proteina odgovara eksperimentalnim opažanjima (**slike 5.2** i **5.3**). U modelu se motori najbrže akumuliraju nakon što mikrotubuli postignu antiparalelnu konfiguraciju (bijelo područje na **slici 6.2a**, sredina), što se ne opaža u eksperimentima (**slika 5.3**). Ova razlika može biti posljedica većeg preklapanja mikrotubula i većeg rezervoara vezivnih proteina u modelu u usporedbi s eksperimentima. Na **slici 6.2b** prikazani su isječci iz animacije koja odgovara **slici 6.2a** u 3 ključna trenutka: u fazi kada mikrotubuli pretražuju prostor oko sebe nasumičnim kutnim gibanjem (gore), u fazi kada mikrotubuli dođu u kontakt i motorni proteini se krenu nakupljati (sredina) i u fazi kada je formiran stabilni antiparalelni svežanj (dolje).

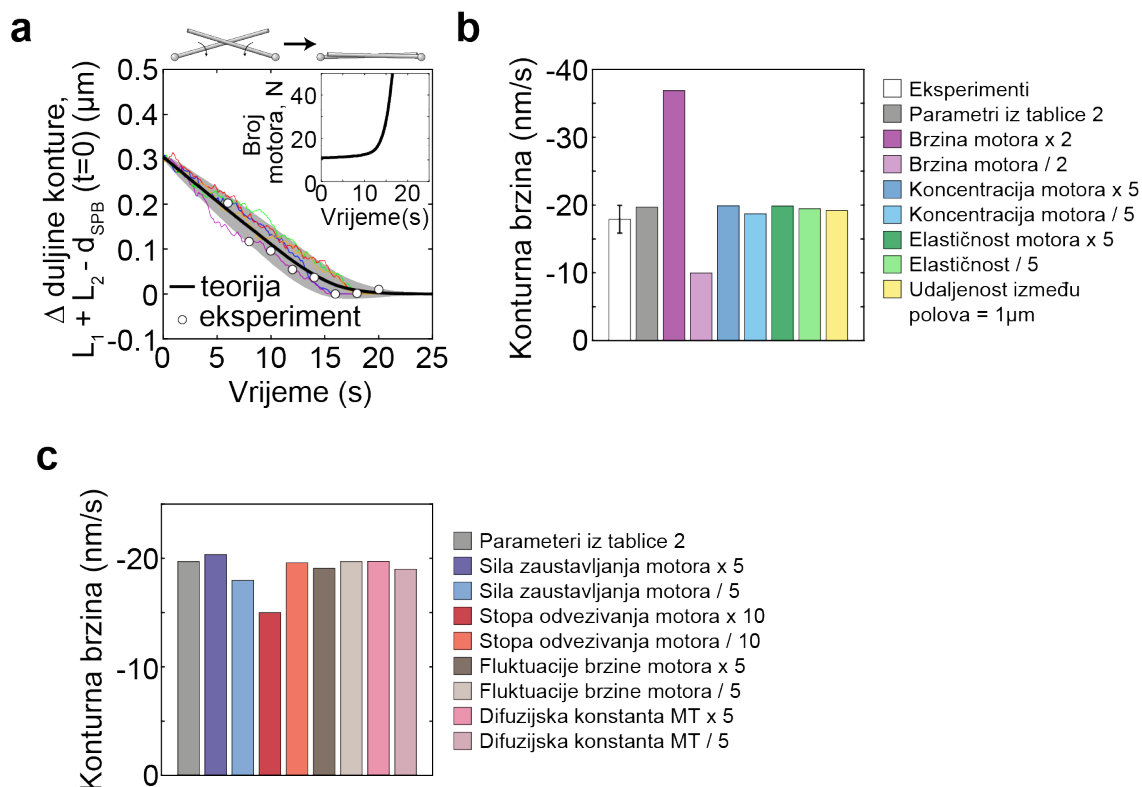


**Slika 6.2:** *Primjer putanje mikrotubula koji rezultira formiranjem antiparalelnog svežnja. a, u gornjem grafu prikazali su polarni kutovi označeni crvenom bojom za prvi i plavom bojom za drugi mikrotubul. U antiparalelnoj konfiguraciji, prvi mikrotubul ima polarni kut  $\theta_1 = 0^\circ$ , a drugi  $\theta_2 = 180^\circ$ . Srednji graf prikazuje broj vezanih motornih proteina na mikrotubule, a donji graf prikazuje udaljenost između dvije najbliže točke na mikrotubulima. Osjenčana područja prikazuju faze pretraživanja i poravnanja (tamno i svijetlo siva), a neosjenčana regija označava formirani antiparalelni svežanj. Vrijednosti parametara u simulaciji u  $R_{1,2} = 1.5 \mu\text{m}$ ,  $d_{\text{SPB}} = 2 \mu\text{m}$ ,  $n_{\text{MT}} = 2$ , dok su ostali parametri dani u tablici 2. b, Ilustracija faze pretraživanja (gore), poravnanja (sredina) te formiranog antiparalelnog svežnja (dno). Sive kugle predstavljaju polove diobenog vretena, sivi štapovi mikrotubule, a zenele kugle povezane linijom predstavljaju motorne proteine. Vrijeme je dano u min:s.*

Ključni korak u formiranju antiparalelnih svežnjeva je bočno klizanje mikrotubula prema antiparalelnom poravnanju koje pokreću motorni proteini koji se vežu u blizini kontaktne točke mikrotubula. U eksperimentima smo pokazali da se duljina konture mikrotubula smanjila tijekom njihove rotacije u antiparalelno poravnanje. Kako bismo bolje razumjeli ove eksperimentalne rezultate koristimo naš teorijski model za istraživanje duljine konture mikrotubula. Budući da nas ovdje zanima proces poravnanja, naše izračune počinjemo iz konfiguracije u kojoj su mikrotubuli već u kontaktu (shema iznad **slike 6.3a**). Naši rezultati pokazuju da se razlika duljine konture smanjuje prema nuli i nakon toga ostaje konstantna,  $L_1 + L_2 \approx d_{\text{SPB}}$  (**slika 6.3a**). Ovaj proces pokreću motori koji se u početku sporo akumuliraju, a kada se mikrotubuli približe poravnatoj konfiguraciji akumulacija se ubrzava jer se povećava

površina duž mikrotubula gdje su dovoljno blizu jedan drugom da se motori mogu spajati (**slika 6.3a**, umetnuti graf). Duljina konture smanjuje se linearno brzinom  $2v_0$  koja odgovara dvostrukoj brzini motora duž svakog mikrotubula. Smanjenje duljine konture tijekom poravnanja mikrotubula implicira da motori akumulirani na mjestu kontakta mikrotubula imaju usmjerenje prema polovima diobenog vretena. Također, brzina kojom se duljina konture smanjuje direktno govori o brzini kojom motori koračaju po mikrotubulima. Kako bismo istražili predikcije modela, varirali smo parametre i našli smo da je brzina kojom se kontura smanjuje proporcionalna brzini motora. Zanimljivo je da koncentracija motora, rigidnost opruge motora te udaljenost između polova ima minoran utjecaj na brzinu smanjena konture (**slika 6.3b i c**). Predikcija da brzina smanjena konture ne ovisi o udaljenosti između polova implicira da je ta brzina robusna mjera koja je otporna na promjene u geometriji sustava. Također, ovu predikciju možemo eksperimentalno testirati tako da podijelimo stanice u dvije skupine, one sa udaljenosti među polovima manjom ili većom od  $1.85 \mu m$ . Ono što smo otkrili analizom eksperimentalnih podataka je da se brzina konture doista ne razlikuje za ove dvije skupine stanica (izmjerene brzine konture  $-18 \pm 5$  nm/s i  $-24 \pm 6$  nm/s za stanice s udaljenosti između polova od  $1.69 \pm 0.03 \mu m$  i  $2.3 \pm 0.2 \mu m$ ;  $n=14$ ;  $p=0.5$  iz t-testa za brzine). Naši rezultati sugeriraju da motorni proteini vuku mikrotubule jedan po drugome te ih na taj način poravnavaju u antiparalelni svežanj, a brzinu i usmjerenje motora kvantificiramo pomoću duljine konture mikrotubula.

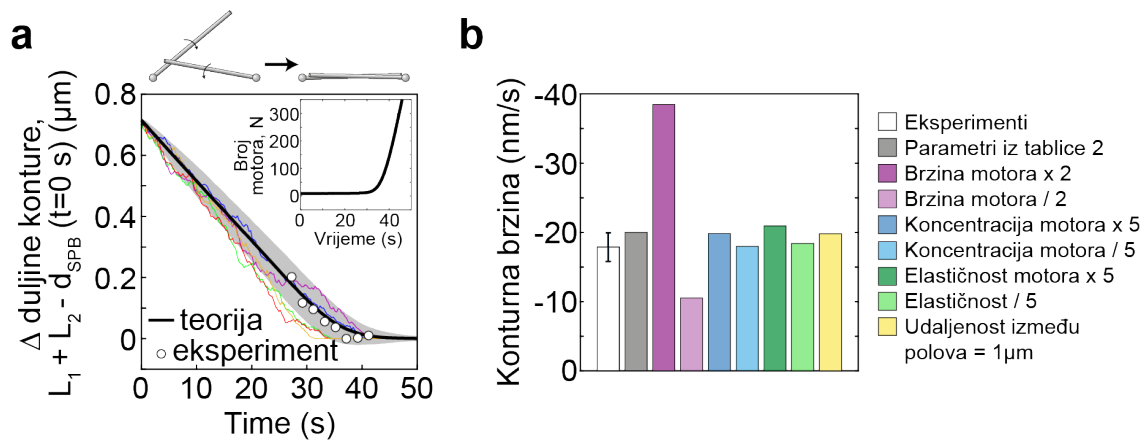




**Slika 6.3: Promjena duljine konture za simetričnu konfiguraciju. a,** promjena duljine konture (glavni graf) i broj motora (umetnuti graf) kao funkcija vremena. U simulacijama, mikrotubuli počinju iz simetrične konfiguracije u kojoj je kut između mikrotubula  $120^\circ$ , a udaljenost među njima je zanemariva,  $y_{\min} \approx 0$ . Duljinu konture definiramo kao zbroj duljina  $L_1$  i  $L_2$  koje se protežu od jednog polova do točke na mikrotubulu koja je najbliža drugom mikrotubulu, a promjena duljine konture računa se kao  $L_1 + L_2 - d_{SPB}$ . Crna linija i osjenčano područje predstavljaju prosječnu vrijednost i standardnu devijaciju za sve rezultate simulacije u danoj vremenskoj točki. Linije u boji predstavljaju 5 realizacija simulacije. Bijele točke predstavljaju eksperimentalne srednje vrijednosti iz **slike 5.2d** translahirane u vremenu za prosječno vrijeme formiranja svežnja iz simulacija. Parametri u simulacijama su iz tablice 2,  $d_{SPB} = 2\mu\text{m}$ ,  $R_{1,2} = 2\mu\text{m}$  and  $n_{MT} = 2$ . **b,** Konturna brzina u eksperimentima (bijeli stupac; pogreška je izražena kao s.e.m.; podaci iz **slike 5.2d**) i u simulacijama za različite vrijednosti parametara (stupci u boji). U legendi su označena odstupanja od vrijednosti parametara u tablici 2 i  $d_{SPB} = 2\mu\text{m}$ . Duljine mikrotubula su  $R_{1,2} = 2\mu\text{m}$  osim u zadnjem stupcu gdje je  $R_{1,2} = 1\mu\text{m}$ . Početna konfiguracija je ista kao u panelu a. **c,** Konturna brzina u simulacijama počevši od simetrične konfiguracije za različite vrijednosti parametara. Odstupanja od vrijednosti parametara iz Tablice 2 naznačena su u legendi;  $d_{SPB} = 2\mu\text{m}$  i  $R_{1,2} = 2\mu\text{m}$ .

Kako bismo isključili mogućnost da je formiranje antiparalelnog svežnja uvjetovano početnim uvjetom u kojem imamo mikrotubule u kontaktu u simetričnoj konfiguraciji, ponovili smo sve simulacije krećući od početnog uvjeta u kojem su mikrotubuli u antisimetričnoj konfiguraciji (**slika 6.4a**). Našli smo da početna konfiguracija mikrotubula ne utječe na dinamiku duljine konture kao ni na donesene zaključke o povezanosti brzine smanjena konture s brzinom kretanja motornih proteina. Varijacije parametara s početnom asimetričnom konfiguracijom pokazuju

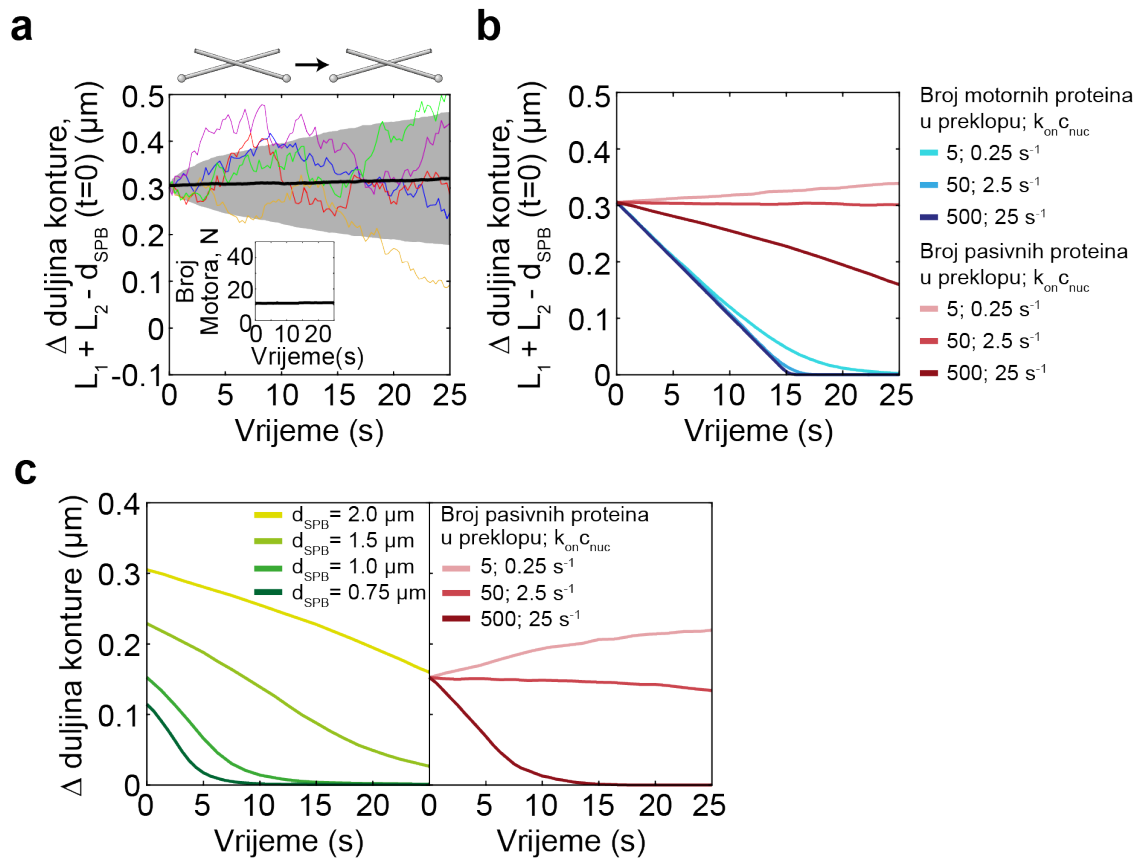
da vrijede svi zaključci koje smo donijeli analizom parametara sa simetričnom konfiguracijom (slika 6.4b).



**Slika 6.4: Promjena duljine konture za asimetričnu konfiguraciju. a**, promjena duljine konture (glavni graf) i broj motora (umetnuti graf) kao funkcija vremena. U simulacijama, mikrotubuli počinju iz asimetrične konfiguracije u kojoj su početni kutovi  $\theta_1 = 60^\circ$  i  $\theta_2 = 150^\circ$ , a udaljenost među mikrotubulima je zanemariva,  $y_{\min} \approx 0$ . Crna linija i osjenčano područje predstavljaju prosječnu vrijednost i standardnu devijaciju za sve rezultate simulacije u danoj vremenskoj točki. Linije u boji predstavljaju 5 realizacija simulacije. Bijele točke predstavljaju eksperimentalne srednje vrijednosti iz **slike 5.2d** translahirane u vremenu za prosječno vrijeme formiranja svežnja iz simulacija. Parametri u simulacijama su iz tablice 2,  $d_{\text{SPB}} = 2 \mu\text{m}$ ,  $R_{1,2} = 2 \mu\text{m}$  and  $n_{\text{MT}} = 2$ . **b**, Konturna brzina u eksperimentima (bijeli stupac; pograška je izražena kao s.e.m.; podaci iz **slike 5.2d**) i u simulacijama za različite vrijednosti parametara (stupci u boji). U legendi su označena odstupanja od vrijednosti parametara u tablici 2 i  $d_{\text{SPB}} = 2 \mu\text{m}$ . Duljine mikrotubula su  $R_{1,2} = 2 \mu\text{m}$  osim u zadnjem stupcu gdje je  $R_{1,2} = 1 \mu\text{m}$ . Početna konfiguracija je ista kao u panelu a.

Alternativni scenarij za objašnjene formiranja antiparalelnih svežnjeva je da umjesto aktivnih motornih proteina, pasivni vezujući proteini pokreću proces formiranja antiparalelnih svežnjeva. Kako bi istražili ovaj scenarij, koristimo naš model u kojem smo prilagodili parametre tako da opisuje interakciju mikrotubula posredovanu pasivnim vezujućim proteinima. Za razliku od rezultata s motornim proteinima, mikrotubulima koji interagiraju samo preko pasivnih vezivnih proteina duljina konture ostaje konstantna (**slika 6.5a**) iako su pasivni vezujući proteini cijelo vrijeme zakačeni za oba mikrotubula (umetnuti graf na **slici 6.5a**). Budući da pasivni vezujući proteini nemaju usmjereno gibanje, ne proizvode dovoljnu silu na mikrotubule koja bi ih mogla rotirati u antiparalelnu organizaciju čak ni ukoliko nerealistično povećamo njihovu koncentraciju za dva reda veličine (crvene linije na **slici 6.5b**). Nasuprot tome motorni proteini, neovisno o njihovoj koncentraciji, jednako rotiraju mikrotubule u antiparalelnu organizaciju brzinom koja je eksperimentalno izmjerena (plave linije na **slici 6.5b**). No, podsjetimo se tijekom neperturbirane stanične diobe u kvascu, polovi

diobenog vretena su vrlo blizu jedan drugome stoga da bi istražili mogu li pasivni vezujući proteini u tom slučaju pokretati formiranje antiparalelnih svežnjeva iskoristili smo naš model za simulaciju dinamike mikrotubule i pasivnih proteina za male udaljenosti. Dobili smo da se za male udaljenosti između polova i velike koncentracije pasivnih proteina promjena duljine konture zaista smanjuje usporedivo s eksperimentalnim opažanjima (zelene linije na **slici 6.5c**). No ukoliko smanjimo koncentraciju pasivnih proteina smanjene konture događa se znatno sporije (crvene linije na **slici 6.5c**). Stoga, model s pasivnim proteinima ne može objasniti eksperimentalno smanjenje konture iz **slike 5.2d** no može imati utjecaja na formiranje antiparalelnih svežnjeva za male udaljenosti između polova. Svakako, pasivni vezivni proteini imaju bitnu ulogu u stabilizaciji mikrotubula u diobenom vretenu.



**Slika 6.5: Utjecaj pasivnih vezivnih proteina na duljinu konture.** *a*, promjena duljine konture (glavni graf) i broj pasivnih vezivnih proteina (umetni graf) kao funkcija vremena dobiveni iz modela. Početna konfiguracija i ostale oznake su iste kao na **slici 6.3a**. *b*, promjena duljine konture kao funkcija vremena za različite koncentracije motornih proteina (plave linije) i pasivnih vezivnih proteina (crvene linije) kao što je naznačeno u legendi. Početna geometrija i drugi parametri isti su kao u panelu *a*. *c*, promjena duljine konture kao funkcija vremena za različite udaljenosti između polova (lijevo) i za različite koncentracije pasivnih vezivnih proteina (desno) dobivena iz modela. Zelene linije predstavljaju prosječnu vrijednost promjene duljine konture za različite udaljenosti između polova prikazane u legendi i koncentraciju pasivnih vezivnih proteina  $25 \text{ s}^{-1}$  (500 pasivnih vezivnih proteina u preklopu mikrotubula). Crvene linije predstavljaju prosječnu vrijednost promjene duljine konture za različiti broj

pasivnih vezivnih proteina u preklopu mikrotubula (različitu koncentraciju pasivnih vezivnih proteina) prikazanih u legendi i  $d_{\text{SPB}} = 1\mu\text{m}$ . Početna konfiguracija je simetrična i ostali parametri su iz tablice 2 osim onih koji se razlikuju između motornih proteina i pasivnih vezivnih proteina: difuzijska konstanta  $D_c = 0.05\mu\text{m}^2/\text{s}$  (Kapitein et al., 2008), ravnotežno istegnuće  $y_0 = 40\text{nm}$  (Kellogg et al., 2016).

### 6.2.1 Odabir parametara

Naš model ima 11 parametara od kojih je 1 slobodan (parametar koncentracije motora  $k_{\text{on}} c_{\text{nuc}}$ ). Imamo 5 parametara povezanih s motorima, koje smo procijenili na temelju prethodnih in vitro mjerenja za motorni protein kinezin-5. Kretanje motora opisano je njihovom brzinom pri nultom opterećenju,  $v_0 = -0.01\mu\text{m}/\text{s}$ , što smo procijenili kao polovicu izmjerene konturne brzine (koja je otprilike  $-0.02\mu\text{m}/\text{s}$ ), s obzirom da tetramerni motori hodaju duž svakog mikrotubula s polovicom ove brzine. Disperzija brzine motora,  $D_v = 4 \times 10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$ , procjenjuje se na temelju teorije ( $D_v = rv_0 d/2$ , gdje je  $d = 36\text{nm}$  veličina koraka kinezina, a  $r \approx 0.39$  nasumičnost opažena u eksperimentima s optičkom pincetom (Kolomeisky & Fisher, 2007)). Za silu zaustavljanja upotrijebili smo  $f_0 = -1.5\text{pN}$  izmjerenu za motorni protein Cin8 iz pupajućeg kvasca (Fallesen et al., 2017). Brzina odvezivanja motora od  $0.1\text{s}^{-1}$  procijenjena je iz ref. (Roostalu et al., 2011). Vrijednost parametra koncentracije motora je grubo procijenjena tako da postoji 30 motora priključenih kada su mikrotubuli u kontaktu i kut između njih je  $120^\circ$ ,  $k_{\text{on}} c_{\text{nuc}} = 1.3\text{s}^{-1}\mu\text{m}^{-1}$ . Motor je opisan kao Hookeova opruga s nultom duljinom mirovanja čija se elastičnost izračunava tako da očekivana duljina motora u termalnoj ravnoteži odgovara duljini vrata motora,  $53\text{nm}$ , slika 3c u ref. (Kashina et al., 1996).

Za mikrotubule imamo 2 parametra: konstantu difuzije  $D_{1,2}$  i duljinu mikrotubula  $R_{1,2}$ . Konstantu difuzije izračunavamo kao  $D \propto R^{-3}$  (Kalinina et al., 2012). Za mikrotubule duljine pretpostavljamo da slijede eksponencijalnu distribuciju. Očekivana vrijednost izmjerenih mikrotubula duljina je  $1.5\mu\text{m}$  (Kalinina et al., 2012). Pretpostavljamo da je distribucija duljina mikrotubula eksponencijalna (Cojoc et al., 2016), ali mjerenja uzimaju u obzir samo mikrotubule dulje od  $0.7\mu\text{m}$ , tako da je stvarna distribucija  $R \sim \text{Exp}(1/0.8\mu\text{m}^{-1})$ , što daje očekivana vrijednost  $R_{1,2} = 0.8\mu\text{m}$ . Mijenjali smo udaljenost između polova u rasponu kako bismo odgovarali varijabilnosti među stanicama u našim eksperimentima. Jezgra je aproksimirana kao sfera polumjera  $R_c = 1.5\mu\text{m}$ , vrijednost koja se procjenjuje iz nuklearnog volumena (Neumann & Nurse, 2007).

**Tablica 2:** Parametri modela.

Parametar		Vrijednost	Izvor
$v_0$	Brzina motora	$-0.01 \mu\text{m/s}$	Procjenjeno iz konturne brzine
$D_v$	Fluktuacije brzine motora	$5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$	(Kolomeisky & Fisher, 2007)
$f_0$	Zaustavna sila	$-1.5 \text{ pN}$	(Fallesen et al., 2017)
$k_{\text{on}}c_{\text{nuc}}$	Parametar koncentracije motora	$1.3 \text{ s}^{-1}\mu\text{m}^{-1}$	Procjenjeno
$k_{\text{off}}$	Stopa odvezivanja motora	$0.1 \text{ s}^{-1}$	Procjenjeno iz ref. (Roostalu et al., 2011)
$k$	Elastičnost motora	$3 \text{ pN}/\mu\text{m}$	Procjenjeno iz ref. (Kashina et al., 1996)
$\langle R_{1,2} \rangle$	Očekivana duljina mikrotubula	$0.8 \mu\text{m}$	(Kalinina et al., 2012)
$D_{1,2}$	Difuzijska konstanta mikrotubula	$0.003/R_{1,2}^3$	(Kalinina et al., 2012; Neumann & Nurse, 2007)
$d_{\text{SPB}}$	Udaljenost polova	$0.5 - 2.5 \mu\text{m}$	Izmjereno ovdje
$R_C$	Radijus jezgrine ovojnice	$1.5 \mu\text{m}$	(Neumann & Nurse, 2007)

## 7 Zaključak

Dioba stanica je fascinantan proces tijekom kojega se iznova formira diobeno vreteno koje precizno dijeli genetski materijal koji se diobom propagira generacijama stanica. U ovom radu teorijski smo istražili dva aspekta stanične diobe, (i) Proučili smo kako pogreške u diobi genetskog materijala utječu na evoluciju kariotipa te (ii) koji su to glavni mehanizmi koji pokreću formiranje diobenog vretena jer je to preduvjet za preciznu propagaciju kariotipa kroz generacije.

Za istraživanje evolucije kariotipa razvili smo teorijski model koji uključuje tri moguća ishoda stanične diobe, ispravnu diobu, missegregaciju i apoptozu. Dva glavna izazova s kojima smo se suočili su: veliki broj kombinacija kariotipa i veliki broj stanica koji tumorska tkiva mogu sadržavati. Kako bismo doskočili tim problemima, osmislili smo novi pristup temeljen na konceptu makro-kariotipa koji sadrži sve relevantne informacije o točnom kariotipu stanice, dok značajno smanjuje broj kombinacija kariotipa te omogućuje korištenje izračuna srednjeg polja, pomoću kojega se mogu opisati velike populacije stanica. Usporedbom naše teorije s eksperimentalno opaženim kariotipima u različitim stadijima razvoja limfoma timusa otkrili smo da u ranim fazama razvoja, povećana apoptoza i sporija proliferacija stanica s monosomijama dovode do dominacije kromosomskih dobitaka u odnosu na gubitke. U kasnijim fazama, kada su već razvijene tumorske stanice, naš model predviđa da eksperimentalno opaženi visoki dobici kromosoma 15 su posljedica proliferacije koja ovisi o kariotipu dok su slučaju dobitaka kromosoma 14 i 15 kooperacija proliferacije i apoptoze može također biti objašnjenje. Jedinstvenost našeg matematičkog modela je što objašnjava sve faze razvoja tumora i predviđa da je evolucija specifičnih tumorskih kariotipa primarno vođena proliferativnom prednošću specifičnih aneuploidnih kariotipova. Ova teorijska predviđanja, u kombinaciji s kvantitativnim mjerenjima missegregacije i proliferacije u aneuploidnim stanicama, mogu doprinijeti razumijevanju mehanizama koji dovode do evolucije tumorskog kariotipa.

Za razumijevanje formiranja antiparalelnog svežnja, koji je jedan od glavnih elemenata diobenog vretena razvili smo teorijski model koji uključuje sile koje stvaraju motorni proteini i nasumične termalne sile. Proces formiranja antiparalelnog svežnja sastoji se od faze pretraživanja u kojoj mikrotubuli pod utjecajem termalnih sila vrše nasumičnu rotaciju oko polova te faze poravnanja u kojoj su mikrotubuli dovoljno blizu da se motorni proteini mogu vezati na njih te generirati usmjerene sile koje pokreću mikrotubule. Rezultati modela pokazali

su da se duljina konture smanjuje linearno u vremenu nakon što mikrotubuli dođu u kontakt što upućuje na to da motorni proteini koji se gibaju prema minus kraju mikrotubula pokreću rotaciju mikrotubula u antiparalelnu konfiguraciju. Pokazali smo da geometrija mikrotubula u trenutku kada se motorni proteini spoje na njih ne mijenja stopu kojom se kontura smanjuje prilikom rotacije u antiparalelnu konfiguraciju. Također smo otkrili da pasivni vezujući proteini sami ne mogu objasniti eksperimentalno smanjenje konture no mogu doprinosti smanjenu konture u procesu poravnanja. Budući da je antiparalelni svežanj glavni element svakog diobenog vretena, razumijevanje kako se ono formira pridonosi razumijevanju formiranja kompleksne strukture diobenog vretena općenito.

Rezultati ovog rada doprinose razumijevanju glavnih čimbenika za ispravno formiranje diobenog vretena i mehanizama kojima diploidna stanica evoluirala do specifičnih aneuploidnih kariotipa. Model za evoluciju kariotipa vrlo je bogat model koji se može generalizirati i primijeniti na razne sustave. Primjerice kariotipi u ljudskim tumorima također karakteriziraju izraženi dobici i gubici specifičnih kromosoma, slično obrascima kariotipa koji su ovdje proučavani (Bolhaqueiro et al., 2019). U budućnosti bi bilo zanimljivo implementirati "model makro-kariotipa" na ljudske tumore i vidjeti jesu li pokretački mehanizam evolucije kariotipa tumora identificiran u ovom radu relevantan i za ljudske tumore.

## 8 Dodatak

### 8.1 Izračun stopa missegregacije i apoptoze

Kako bismo izračunali stopu missegregacije i apoptoze, koju koristimo u našem pristupu srednjeg polja, iz odgovarajućih vjerojatnosti, integriramo jednadžbu. (3.6) i uspoređujemo dobiveni broj stanica s brojem stanica izračunatim iz diskretnih staničnih dioba. U slučaju kada su početno sve stanice diploidne, broj stanica s kariotipovima  $\mathbf{K}_{2n} \pm \mathbf{e}_i$  je zanemariv tijekom prve generacije, pa stoga zanemarujemo te doprinose u jednadžbi (3.6) te dobivamo

$$\frac{dN(\mathbf{K}_{2n})}{dt} = [k_d(\mathbf{K}_{2n}) - k_m(\mathbf{K}_{2n}) - k_a(\mathbf{K}_{2n})]N(\mathbf{K}_{2n}). \quad (8.1)$$

Budući da su svi članovi u jednadžbi (8.1) ovise o istom kariotipu,  $\mathbf{K}_{2n}$ , izostavljamo ga iz naše oznake u ostatku izvoda. Upotrebom izraza  $k_d + k_m + k_a = \beta$  i definicije za missegregaciju i apoptozu,  $k_{m,a} = \beta p'_{m,a}$ , gdje  $p'_{m,a}$  označava efektivne vjerojatnosti za missegregaciju i apoptozu, naša jednadžba glasi,

$$\frac{dN}{dt} = [1 - 2(p'_m + p'_a)]\beta N. \quad (8.2)$$

Ova jednadžba ima analitičko rješenje, a broj stanica nakon vremena  $t_0$  jednak je  $N_0 e^{[1-2(p'_m+p'_a)]\beta t_0}$ . Uzimajući u obzir izraz  $\beta t_0 = \ln 2$  dobivamo,

$$N(t = t_0) = N_0 e^{\ln 2} e^{-2(p'_m+p'_a)\ln 2}. \quad (8.3)$$

Nakon linearne aproksimacije eksponencijalne funkcije dobivamo,

$$N(t = t_0) \approx 2N_0 [1 - 2(p'_m + p'_a) \ln 2]. \quad (8.4)$$

S druge strane, u stohastičkom pristupu stanične diobe se događaju nakon vremena  $t_0$ , a broj stanica je dan sa  $N_{\text{stoch.}} = 2N_0 [1 - (p_m + p_a)]$ . Budući da bi broj stanica trebao biti jednak korištenjem oba pristupa, efektivne vjerojatnosti dane su kao  $p'_{m,a} = p_{m,a}/2 \ln 2$ , što daje odgovarajuće stope  $k_{m,a} = \beta p_{m,a}/2 \ln 2$ .

### 8.2 Aproksimativni izraz za kromosomske dobitke

Kako bismo procijenili kromosomske dobitke, računamo broj stanica s tri kopije itog kromosoma,  $N(\mathbf{K}_{2n} + \mathbf{e}_i)$ , pomoću jednadžbe (3.6). U početku su sve stanice diploidne i u



režimu male vjerojatnosti missegregacije i za mali broj generacija, gdje većina stanica ima diploidne kariotipove,  $N(\mathbf{K}_{2n} + \mathbf{e}_i) \ll N(\mathbf{K}_{2n})$ , jednačbe (3.6) pojednostavljuje se na,

$$\frac{dN(\mathbf{K}_{2n} + \mathbf{e}_i)}{dt} = \beta N(\mathbf{K}_{2n} + \mathbf{e}_i) + (2 \ln 2)^{-1} p_0 c_i \beta N(\mathbf{K}_{2n}). \quad (8.5)$$

Broj stanica  $N(\mathbf{K}_{2n})$  u drugom članu na desnoj strani dobiva se iz jednačbe  $dN(\mathbf{K}_{2n})/dt = \beta N(\mathbf{K}_{2n})$  i raste eksponencijalno u vremenu,  $N(\mathbf{K}_{2n}) = N_0 e^{\beta t}$ , gdje je  $N_0$  početni broj stanica. Rješavanjem jednačbe (8.5) dobivamo izraz za broj stanica s kromosomskim dobitkom,

$$N(\mathbf{K}_{2n} + \mathbf{e}_i) = (2 \ln 2)^{-1} p_0 c_i \beta N_0 t e^{\beta t}. \quad (8.6)$$

Općenito, dobitak definiramo kao broj stanica s viškom kromosomom u odnosu na ukupni broj diploidnih stanica, dobitak =  $N(\mathbf{K}_{2n} + \mathbf{e}_i)/N(\mathbf{K}_{2n})$  i u ovom slučaju dobitak je jednak

$$\text{dobitak} = (2 \ln 2)^{-1} p_0 c_i \beta t. \quad (8.7)$$

Na kraju, uzimajući u obzir da je  $\beta = \ln 2 / t_0$  i da je  $c_i = 2$  dobivamo konačan izraz za kromosomski dobitak

$$\text{dobitak} = p_0 t / t_0. \quad (8.8)$$

## 9 Popis literature

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (Sixth Edition). Garland Science.
- Araujo, A., Baum, B., & Bentley, P. (2013). The Role of Chromosome Missegregation in Cancer Development: A Theoretical Approach Using Agent-Based Modelling. *PLOS ONE*, 8(8), e72206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072206>
- Ben-David, U., & Amon, A. (2019). Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 21, 44–62. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0171-x>
- Blackwell, R., Edelmaier, C., Sweezy-Schindler, O., Lamson, A., Gergely, Z. R., O'Toole, E., Crapo, A., Hough, L. E., McIntosh, J. R., Glaser, M. A., & Betterton, M. D. (2017). Physical determinants of bipolar mitotic spindle assembly and stability in fission yeast. *Science Advances*, 3(1), e1601603. [https://doi.org/10.1126/SCIADV.1601603/SUPPL\\_FILE/1601603\\_VIDEO\\_S6.MOV](https://doi.org/10.1126/SCIADV.1601603/SUPPL_FILE/1601603_VIDEO_S6.MOV)
- Bolhaqueiro, A. C. F., Ponsioen, B., Bakker, B., Klaasen, S. J., Kucukkose, E., van Jaarsveld, R. H., Vivié, J., Verlaan-Klink, I., Hami, N., Spierings, D. C. J., Sasaki, N., Dutta, D., Boj, S. F., Vries, R. G. J., Lansdorp, P. M., van de Wetering, M., van Oudenaarden, A., Clevers, H., Kranenburg, O., ... Kops, G. J. P. L. (2019). Ongoing chromosomal instability and karyotype evolution in human colorectal cancer organoids. *Nature Genetics*, 51, 824–834. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0399-6>
- Bormuth, V., Varga, V., Howard, J., & Schäffer, E. (2009). Protein friction limits diffusive and directed movements of kinesin motors on microtubules. *Science*, 325(5942), 870–873. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1174923/SUPPL\\_FILE/BORMUTH.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1174923/SUPPL_FILE/BORMUTH.SOM.PDF)
- Brugués, J., & Needleman, D. (2014). Physical basis of spindle self-organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409404111>
- Brugués, J., Nuzzo, V., Mazur, E., & Needleman, D. J. (2012). Nucleation and transport organize microtubules in metaphase spindles. *Cell*, 149(3), 554–564. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.03.027>
- Burbank, K. S., Mitchison, T. J., & Fisher, D. S. (2007). Slide-and-Cluster Models for Spindle Assembly. *Current Biology*, 17(16), 1373–1383. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2007.07.058>
- Chiarella, C., He, X.-Z., & Nikitopoulos, C. S. (2015). *Derivative Security Pricing: Techniques, Methods and Applications* (2015th ed.). Springer.
- 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. *Scientific Reports*, 6, 25736. <https://doi.org/10.1038/srep25736>
- Cytrynbaum, E. N., Scholey, J. M., & Mogilner, A. (2003). A Force Balance Model of Early Spindle Pole Separation in *Drosophila* Embryos. *Biophysical Journal*, 84, 757–769.
- Cytrynbaum, E. N., Sommi, ‡ P, Brust-Mascher, ‡ I, Scholey, J. M., & Mogilner, A. (2005). Early Spindle Assembly in *Drosophila* Embryos: Role of a Force Balance Involving Cytoskeletal Dynamics and Nuclear Mechanics □ D □ V. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 4967–4981. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-02-0154>
- Ding, R., Mcdonald, K. L., & McIntosh, J. R. (1993). Three-Dimensional Reconstruction and Analysis of Mitotic Spindles from the Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Biology*, 120, 141–151.

- Ding, R., West, R. R., Morphew, M., Oakley, B. R., & McIntosh, J. R. (1997). The Spindle Pole Body of *Schizosaccharomyces pombe* Enters and Leaves the Nuclear Envelope as the Cell Cycle Proceeds. *Molecular Biology of the Cell*, *8*, 1461–1479.
- Duijf, P. H. G., & Benezra, R. (2013). The cancer biology of whole-chromosome instability. *Oncogene*, *32*, 4727–4736. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.616>
- Elizalde, S., Laughney, A. M., & Bakhoum, S. F. (2018). A Markov chain for numerical chromosomal instability in clonally expanding populations. *PLoS Computational Biology*, *14*, e1006447. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006447>
- Fallesen, T., Roostalu, J., Duellberg, C., Pruessner, G., & Surrey, T. (2017). Ensembles of Bidirectional Kinesin Cin8 Produce Additive Forces in Both Directions of Movement. *Biophysical Journal*, *113*(9), 2055–2067. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.006>
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. F.C.W. Vogel.
- Ganem, N. J., Godinho, S. A., & Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*, *460*, 278–282. <https://doi.org/10.1038/nature08136>
- Garribba, L., & Santaguida, S. (2022). The Dynamic Instability of the Aneuploid Genome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 838928. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.838928>
- Gudimchuk, N. B., & Richard McIntosh, J. (2021). Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22*, 777–795. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00399-x>
- Gusev, Y., Kagansky, V., & Dooley, W. C. (2001). Long-Term Dynamics of Chromosomal Instability in Cancer: A Transition Probability Model. *Mathematical and Computer Modelling*, *33*, 1253–1273. [https://doi.org/10.1016/S0895-7177\(00\)00313-7](https://doi.org/10.1016/S0895-7177(00)00313-7)
- Gusev, Y., Kagansky, V., & Dooley, W. C. (2000). A Stochastic Model of Chromosome Segregation Errors with Reference to Cancer Cells. *Mathematical and Computer Modelling*, *32*, 97–111. [https://doi.org/10.1016/S0895-7177\(00\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0895-7177(00)00122-9)
- Hepperla, A. J., Willey, P. T., Coombes, C. E., Schuster, B. M., Gerami-Nejad, M., McClellan, M., Mukherjee, S., Fox, J., Winey, M., Odde, D. J., O’Toole, E., & Gardner, M. K. (2014). Minus-end-directed kinesin-14 motors align antiparallel microtubules to control metaphase spindle length. *Developmental Cell*, *31*(1), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.07.023>
- Higuchi, H., Muto, E., Inoue, Y., & Yanagida, T. (1997). Kinetics of force generation by single kinesin molecules activated by laser photolysis of caged ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(9), 4395–4400. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.9.4395/ASSET/4FE7D628-2E78-4660-A6B0-673A3492007C/ASSETS/GRAPHIC/PQ0872208004.JPEG>
- Hintzen, D. C., Soto, M., Schubert, M., Bakker, B., Spierings, D. C., Szuhai, K., Lansdorp, P. M., Foijer, F., Medema, R. H., & Raaijmakers, J. A. (2021). Monosomies, trisomies and segmental aneuploidies differentially affect chromosomal stability. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.08.31.458318>
- Holland, A. J., & Cleveland, D. W. (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*, 478–487. <https://doi.org/10.1038/nrm2718>
- Howard, J. (2001). *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates.
- Jacobs, K. (2010). *Stochastic Processes for Physicists*. Cambridge University Press.
- 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. *Nature Cell Biology*, *15*(1), 82–87. <https://doi.org/10.1038/ncb2640>

- Kapitein, L. C., Janson, M. E., van den Wildenberg, S. M. J. L., Hoogenraad, C. C., Schmidt, C. F., & Peterman, E. J. G. (2008). Microtubule-Driven Multimerization Recruits ase1p onto Overlapping Microtubules. *Current Biology*, *18*(21), 1713–1717. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2008.09.046>
- Kashina, A. S., Baskin, R. J., Cole, D. G., Wedaman, K. P., Saxton, W. M., & Scholey, J. M. (1996). A bipolar kinesin. *Nature* *1996* *379*:6562, *379*(6562), 270–272. <https://doi.org/10.1038/379270a0>
- Kawaguchi, K. (2008). Energetics of kinesin-1 stepping mechanism. *FEBS Letters*, *582*(27), 3719–3722. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2008.10.019>
- Kellogg, E. H., Howes, S., Ti, S. C., Ramírez-Aportela, E., Kapoor, T. M., Chacón, P., & Nogales, E. (2016). Near-atomic cryo-EM structure of PRC1 bound to the microtubule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(34), 9430–9439. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1609903113/SUPPL\\_FILE/PNAS.1609903113.SM01.MP4](https://doi.org/10.1073/PNAS.1609903113/SUPPL_FILE/PNAS.1609903113.SM01.MP4)
- Kirschner, M., & Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell*, *45*(3), 329–342. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90318-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90318-1)
- Kolomeisky, A. B., & Fisher, M. E. (2007). Molecular Motors: A Theorist’s Perspective. *Annual Review of Physical Chemistry*, *58*, 675–695. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104532>
- Lamson, A. R., Edelmaier, C. J., Glaser, M. A., & Betterton, M. D. (2019). Theory of Cytoskeletal Reorganization during Cross-Linker-Mediated Mitotic Spindle Assembly. *Biophysical Journal*, *116*(9), 1719–1731. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2019.03.013>
- Laughney, A. M., Elizalde, S., Genovese, G., & Bakhoun, S. F. (2015). Dynamics of Tumor Heterogeneity Derived from Clonal Karyotypic Evolution. *Cell Reports*, *12*, 809–820. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.065>
- Lengauer, C., Kinzler, K., & Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, *386*, 623–627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/386623a0>
- Loughlin, R., Heald, R., & Nédélec, F. (2010). A computational model predicts *Xenopus* meiotic spindle organization. *Journal of Cell Biology*, *191*(7), 1239–1249. <https://doi.org/10.1083/JCB.201006076/VIDEO-5>
- Lynch, A. R., Arp, N. L., Zhou, A. S., Weaver, B. A., & Burkard, M. E. (2022). Quantifying chromosomal instability from intratumoral karyotype diversity using agent-based modeling and Bayesian inference. *ELife*, *11*, e69799. <https://doi.org/10.7554/eLife.69799>
- Mccully, E. K., & Robinow, C. F. (1971). Mitosis in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*: A Comparative Study with Light and Electron Microscopy. *Journal of Cell Science*, *9*, 475–507.
- Mcintosh, J. R., Molodtsov, M. I., & Ataullakhanov, F. I. (2012). Biophysics of Mitosis. *Q Review Biophysics*, *45*(2), 147–207. <https://doi.org/10.1017/S0033583512000017>
- Nédélec, F. (2002). Computer simulations reveal motor properties generating stable antiparallel microtubule interactions. *Journal of Cell Biology*, *158*(6), 1005–1015. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202051>
- Neumann, F. R., & Nurse, P. (2007). Nuclear size control in fission yeast. *Journal of Cell Biology*, *179*(4), 593–600. <https://doi.org/10.1083/JCB.200708054/VIDEO-2>
- Pavin, N., & Tolic, I. M. (2016). Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle. *Annual Review of Biophysics*, *45*, 279–298. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010934>
- Petrie, H. T., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual Review of Immunology*, *25*, 649–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115715>

- Phillips, R., Kondev, J., Theriot, J., & Garcia, H. (2013). *Physical Biology of the Cell* (Second Edition). Garland Science.
- Porritt, H. E., Gordon, K., & Petrie, H. T. (2003). Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *Journal of Experimental Medicine*, *198*, 957–962. <https://doi.org/10.1084/jem.20030837>
- Potapova, T., & Gorbsky, G. J. (2017). The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology*, *6*(1), 12. <https://doi.org/10.3390/biology6010012>
- Prelogović, M., Winters, L., Milas, A., Tolić, I. M., & Pavin, N. (2019). Pivot-and-bond model explains microtubule bundle formation. *Physical Review E*, *100*, 012403. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.100.012403>
- Prosser, S. L., & Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*, 187–201. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.162>
- Ricke, R. M., & van Deursen, J. M. (2013). Aneuploidy in health, disease, and aging. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 201, pp. 11–21). <https://doi.org/10.1083/jcb.201301061>
- Rincon, S. A., Lamson, A., Blackwell, R., Syrovatkina, V., Fraisier, V., Paoletti, A., Betterton, M. D., & Tran, P. T. (2017). Kinesin-5-independent mitotic spindle assembly requires the antiparallel microtubule crosslinker Ase1 in fission yeast. *Nature Communications*, *8*(1), 15286. <https://doi.org/10.1038/ncomms15286>
- Roostalu, J., Hentrich, C., Bieling, P., Telley, I. A., Schiebel, E., & Surrey, T. (2011). Directional switching of the kinesin Cin8 through motor coupling. *Science*, *332*(6025), 94–99. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1199945/SUPPL\\_FILE/ROOSTALU-SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1199945/SUPPL_FILE/ROOSTALU-SOM.PDF)
- Sacristan, C., & Kops, G. J. P. L. (2015). Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Trends in Cell Biology*, *25*(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2014.08.006>
- Sagolla, M. J., Uzawa, S., & Cande, W. Z. (2003). Individual microtubule dynamics contribute to the function of mitotic and cytoplasmic arrays in fission yeast. *Journal of Cell Science*, *116*, 4891–4903. <https://doi.org/10.1242/JCS.00796>
- Sheppard, O., Wiseman, F. K., Ruparelia, A., Tybulewicz, V. L. J., & Fisher, E. M. C. (2012). Mouse Models of Aneuploidy. *Scientific World Journal*, *2012*, 214078. <https://doi.org/10.1100/2012/214078>
- Shi, Q., & King, R. W. (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*, *437*, 1038–1042. <https://doi.org/10.1038/nature03958>
- Shoshani, O., Bakker, B., de Haan, L., Tjhuis, A. E., Wang, Y., Kim, D. H., Maldonado, M., Demarest, M. A., Artates, J., Zhengyu, O., Mark, A., Wardenaar, R., Sasik, R., Spierings, D. C. J., Vitre, B., Fisch, K., Fojijer, F., & Cleveland, D. W. (2021). Transient genomic instability drives tumorigenesis through accelerated clonal evolution. *Genes & Development*, *35*, 1093–1109. <https://doi.org/10.1101/gad.348319.121>
- Storchova, Z., & Kuffer, C. (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *Journal of Cell Science*, *121*, 3859–3866. <https://doi.org/10.1242/jcs.039537>
- Svoboda, K., & Block, S. M. (1994). Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell*, *77*(5), 773–784. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90060-4)
- Tamarin, R. H. (1998). *Principles of genetics* (Sixth Edition). McGraw-Hill.
- Thompson, S. L., Bakhoun, S. F., & Compton, D. A. (2010). Mechanisms of Chromosomal Instability. *Current Biology*, *20*(6), R285–95. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2010.01.034>

- Thompson, S. L., & Compton, D. A. (2008). Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *Journal of Cell Biology*, *180*, 665–672. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712029>
- Tolić, I. M. (2018). Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. *European Biophysics Journal*, *47*(3), 191–203. <https://doi.org/10.1007/S00249-017-1244-4>
- Tolić, I. M., Novak, M., & Pavin, N. (2019). Helical Twist and Rotational Forces in the Mitotic Spindle. *Biomolecules*, *9*(4), 132. <https://doi.org/10.3390/BIOM9040132>
- Trakala, M., Aggarwal, M., Sniffen, C., Zasadil, L., Carroll, A., Ma, D., Su, X. A., Wangsa, D., Meyer, A., Sieben, C. J., Zhong, J., Hsu, P. H., Paradis, G., Ried, T., Holland, A., van Deursen, J., & Amon, A. (2021). Clonal selection of stable aneuploidies in progenitor cells drives high-prevalence tumorigenesis. *Genes and Development*, *35*, 1079–1092. <https://doi.org/10.1101/gad.348341.121>
- van Jaarsveld, R. H., & Kops, G. J. P. L. (2016). Difference Makers: Chromosomal Instability versus Aneuploidy in Cancer. *Trends in Cancer*, *2*, 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.09.003>
- van Kampen, N. G. (2007). *Stochastic Processes in Physics and Chemistry* (Thirs Edition).
- Visscher, K., Schnltzer, M. J., & Block, S. M. (1999). Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* *1999* *400*:6740, *400*(6740), 184–189. <https://doi.org/10.1038/22146>
- Weaver, B. A., & Cleveland, D. W. (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Current Opinion in Cell Biology*, *18*, 658–667. <https://doi.org/10.1038/nrg3123>
- Williams, B. R., Prabhu, V. R., Hunter, K. E., Glazier, C. M., Whittaker, C. A., Housman, D. E., & Amon, A. (2008a). Aneuploidy Affects Proliferation and Spontaneous Immortalization in Mammalian Cells. *Science*, *322*, 703–708. <https://doi.org/10.1126/science.1160058>
- Williams, B. R., Prabhu, V. R., Hunter, K. E., Glazier, C. M., Whittaker, C. A., Housman, D. E., & Amon, A. (2008b). Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science*, *322*(5902), 703–709. <https://doi.org/10.1126/science.1160058>
- Wilson, E. B. (1925). *The cell in development and heredity* (Third Edition). The Macmillan Company.
- Winey, M., Mamay, C. L., O’toole, E. T., Mastronarde, D. N., Giddings, T. H., Mcdonald, K. L., & Mcintosh, J. R. (1995). Three-Dimensional Ultrastructural Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* Mitotic Spindle. *Journal of Cell Biology*, *129*, 1601–1615. <http://rupress.org/jcb/article-pdf/129/6/1601/1264411/1601.pdf>
- Wittmann, T., Hyman, A., & Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature Cell Biology*, *3*, E28–E34. <http://cellbio.nature.comE28>
- Wollman, R., Cytrynbaum, E. N., Jones, J. T., Meyer, T., Scholey, J. M., & Mogilner, A. (2005). Efficient chromosome capture requires a bias in the ‘search-and-capture’ process during mitotic-spindle assembly. *Current Biology*, *15*(9), 828–832. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.03.019>
- Yamashita, N., Morita, M., Legant, W. R., Chen, B.-C., Betzig, E., Yokota, H., Mimori-Kiyosue, Y., & Mimori, Y. (2018). Three-dimensional tracking of plus-tips by lattice light-sheet microscopy permits the quantification of microtubule growth trajectories within the mitotic apparatus. *Journal of Biomedical Optics*, *20*(10), 101206. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.10.101206>

## 10 Životopis i popis radova

Ivana Ban rođena je 06.07.1992. u Rijeci. Diplomirala je 2016. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s temom “Uloga pivotiranja mikrotubula u formiranju diobenog vretena” pod mentorstvom prof. dr. sc. Nenada Pavina. Od 2016. godine zaposlena je kao asistentica na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za teorijsku fiziku u grupi prof. dr. sc. Nenada Pavina, u sklopu čega i radi doktorat. Radila je na projektima “Provedba vrhunskih istraživanja u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za kvantne i kompleksne sustave te reprezentacije Liejevih algebri” i ERC-Aneuploidy. Kao asistentica, držala je praktikum iz kolegija Statistika i osnove mjerenja te Početni fizički praktikum za studente istraživačkog smjera i vježbe iz kolegija Kvantni fizika za studente profesorskog smjera Fizičkog odsjeka PMF-a. Aktivno je sudjelovala (usmenom ili posterskom prezentacijom) na 7 međunarodnih i 3 domaća znanstvena skupa. U sklopu znanstvenog rada napisala je dva članka na kojima je dijeljeni prvi autor, koji su objavljeni u CC znanstvenim časopisima:

L. Winters, I. Ban, M. Prelogović, I. Kalinina, N. Pavin., I.M. Tolić, *Pivoting of microtubules driven by minus-end-directed motors leads to spindle assembly*, BMC Biology 17:42 (2019).

Ban, L. Tomašić, M. Trakala, I.M. Tolić and N. Pavin, *Proliferative advantage of specific aneuploid cells drives evolution of tumor karyotypes*, Biophys J 122, 632-645 (2023).