Uloga premosnih mikrotubula u ravnoteži sila diobenog vretena

Novak, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:567368

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Maja Novak

ULOGA PREMOSNIH MIKROTUBULA U RAVNOTEŽI SILA DIOBENOG VRETENA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2017

Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Science

Maja Novak

THE ROLE OF BRIDGING MICROTUBULES IN THE FORCE BALANCE OF MITOTIC SPINDLE

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Associate Professor Nenad Pavin, PhD

Zagreb, 2017

Ovaj doktorski rad izrađen je pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nenada Pavina, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija pri Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

This doctoral thesis was made under the mentorship of Associate Professor Nenad Pavin, PhD, within University post-graduate studies at Physics Department of Faculty of Science, University of Zagreb.

Zahvale

Željela bih se zahvaliti prof. Nenadu Pavinu za požrtvovno vodstvo kroz doktorski studij i sveobuhvatnu pomoć u razvijanju vještina i znanja potrebnih za kvalitetan znanstveni rad. Zatim se želim zahvaliti prof. Ivi Tolić za uvijek konstruktivne rasprave koje su me vodile naprijed kada je trebalo teoriju približiti eksperimentu. Puno se zahvaljujem svojim kolegama iz Pavin i Tolić grupe na razmjeni znanja i iskustava, te ugodnoj atmosferi. Moje posebne zahvale idu prof. Zoranu Basraku na znanstvenoj podršci i vodstvu u razdoblju prije doktorskog studija biofizike. Svojim zahvalama želim obuhvatiti i sve ljude sa Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, kao i sa Instituta «Ruđer Bošković», koji su bili prisutni uz mene na putu od upisa na diplomski studij do doktorata. Konačno, ovaj doktorat ne bi ugledao svijetlo dana bez bezuvjetne i tople podrške moje obitelji na koju sam uvijek mogla računati! Ovaj rad je posvećen mojemu mužu Jurici i mojem sinu Ivanu.

Sažetak

Tijekom stanične diobe, genetski materijal stanice se precizno dijeli u dvije stanice kćeri, čime mehanički i biološki upravlja mreža proteinskih filamenata koju nazivamo diobeno vreteno. Poznato je da ti proteinski filamenti, mikrotubuli, imaju elastična svojstva. Skupina mikrotubula, koju nazivamo kinetohorni mikrotubuli, djeluje silom tenzije na kromosome. Kinetohore su proteinski kompleksi koji su vezani na kromosome. Premda su sile koje djeluju u diobenom vretenu iscrpno istraživane, i dalje je nepoznato kako su one uravnotežene. Poznato je da se između sestrinskog para kinetohora nalazi još jedna skupina mikrotubula, koju mi ovdje nazivamo premosni mikrotubuli. Razvili smo model koji uključuje kinetohorne i premosne mikrotubule, te sile i momente sila koji djeluju među njima.

Mikrotubuli su u modelu opisani kao tanki elastični štapovi koji se svijaju i uvijaju pod djelovanjem sila i momenata sila na njihovim krajevima. Iz oblika snopova mikrotubula, pomoću modela možemo odrediti kolike sile i momenti sila djeluju unutar diobenog vretena. Usporedbom sa izmjerenim oblicima predvidjeli smo da je sila na kinetohori $F_k \sim 300$ pN, a u polu $F_0 \sim 30$ pN. Pokazali smo da premosni mikrotubuli omogućuju koegzistenciju sile kompresije u blizini polova te sile tenzije u blizini kinetohora, što je već niz godina otvoreno pitanje. Pokazali smo da je diobeno vreteno kiralno, te da su za kiralni oblik snopova mikrotubula odgovorni momenti sila u sustavu dva sestrinska kinetohorna vlakna i premosnog vlakna. Zaključujemo da uz sile u diobenom postoje i momenti sila, koje generiraju molekularni motori, te da oni zajedno sa silama određuju njegovu arhitekturu.

Ključne riječi: diobeno vreteno, metafaza, premosni mikrotubuli, teorija elastičnosti, statička Kirchoffova jednadžba, kiralnost

Mentor: izv. prof. dr. sc. Nenad Pavin

Ocjenjivači: dr. sc. Antonio Šiber, znanstveni savjetnik, dr. sc. Igor Weber, znanstveni savjetnik, prof. dr. sc. Hrvoje Buljan

Rad prihvaćen: 12. rujna 2017.

Abstract

At the onset of division, the cell forms a network of protein filaments, mitotic spindle, which divides genetic material between the two nascent daughter cells. It is known that protein filaments, microtubules, behave as elastic objects. Forces that govern the division are exerted by k-fibres, bundles of microtubules which end at the kinetochores, protein complexes which mechanically couple microtubules to the chromosomes. Although forces that exist in mitotic spindle have been studied thoroughly, how they are balanced still remains elusive. It is known that nonkinetochore microtubules exist between the sister pairs of kinetochores, which we term bridging microtubules. We have developed a model that includes k-fibres and bridging fibre, as well as forces and torques acting between them.

We have modelled the microtubule bundles as slender elastic rods that undergo bending and torsion due to the forces and torques exerted at its ends. By using our model and known shape of microtubule bundles, we can infer the forces and torques that are present in mitotic spindle. We have compared shapes obtained from theory and experiment, and predicted that the force at kinetochore is $F_k \sim 300$ pN and the force at pole is $F_0 \sim 30$ pN. By using a theoretical model that includes the bridging fibre, we explained the coexistence of the tension at kinetochores and compression at poles, which has been an open question for a few years now. In addition, we show that mitotic spindle is chiral, and that torques acting on the bridging and k- fibres spindle are responsible for chiral shapes of microtubule bundles. We conclude that, in addition to forces, torques that are generated by the motor proteins exist in the spindle and determine its architecture.

Keywords: mitotic spindle, metaphase, bridging microtubules, elasticity theory, static Kirchoff equation, chirality

Supervisor: Associate Professor Nenad Pavin, PhD

Reviewers: Antonio Šiber, PhD, scientific adviser, Igor Weber, PhD, scientific adviser, Full Professor, Hrvoje Buljan, PhD

Thesis accepted: September 12th 2017.

Extended abstract

Introduction

At the onset of division, the cell forms a spindle, a precise self-constructed micromachine based on microtubules (MTs) and MT-associated proteins, which divides the chromosomes between the two nascent daughter cells. The attachment of MTs to chromosomes is mediated by kinetochores, which are protein complexes on the chromosome. MTs generate forces on kinetochores, which are responsible for kinetochore congression to the metaphase plate, silencing of the spindle assembly checkpoint and segregation of sister kinetochores in anaphase. Spindle MTs can be divided into two major classes with respect to whether they end at the kinetochore (kMTs) or not (non-kMTs). kMTs form parallel bundles known as k-fibres. Likewise, non-kMTs form parallel bundles, but some of them interact with other non-kMTs extending from the opposite spindle pole, thereby forming antiparallel overlap zones, hence they are known as overlap MTs. During metaphase, when kinetochores are bi-oriented, which means that sister kinetochores are attached to k-fibres extending from opposite poles, k-fibres pull on kinetochores. However, non-kMTs have been observed in the vicinity of k-fibres and between sister kinetochores in metaphase, which opens an interesting possibility that they may link sister k-fibres and balance the forces on kinetochores. Yet, the function of these non-kMTs is unknown. Typically, the outer bundles are curved and resemble a C-letter shape. Interestingly, some bundles throughout the spindle resemble the letter S. STED images of the spindle suggest that microtubules are arranged into well-defined bundles exhibiting a variety of shapes, which run continuously almost through the whole spindle.

Theoretical model in two dimensions

To examine the role of the bridging fibre in the force balance on kinetochores, we introduce a theoretical model that includes the bridging fibre as a link between sister k-fibres. The model takes into account the elastic properties of MT bundles and the forces acting at their ends. In general, forces may induce buckling of an elastic rod; thus, the shape of the k-fibres and the bridging fibre depends on the magnitude of the forces at their ends. Briefly,

our model describes two k-fibres and the bridging fibre as elastic rods, which merge at two junction points. The tension between sister kinetochores is described as a pulling force acting at the end of the k-fibre that corresponds to the position of the kinetochore. In the model, we describe our experimental finding that the end points of the k-fibres are clamped at the location of the spindle poles by introducing bending moments acting at the poles.

Comparison to experiment

Even though the shape of the k-fibres and the bridging fibre is a consequence of the forces acting at their ends, we used the shape of these fibres to calculate the forces. The reason for this reverse approach is that in our experiments we measured the shape of the k-fibres and the bridging fibre, whereas we were not able to measure the forces. In particular, we used as input parameters for the model the angle at the spindle pole, the angle at the kinetochore, the spindle length and width, the horizontal position of the kinetochore and the number of MTs in the bridging fibre measured here, as well as the known number of MTs in the k-fibre and the known flexural rigidity of a single MT. By using the measured geometry of the spindle and the known elasticity of MTs, we obtain as the output of the model the position of the junction and the forces at the spindle pole and at the kinetochore.

To experimentally quantify how fast the bridging fibre and the k-fibres straighten after the cut, we measured how much sister kinetochores are tilted with respect to the spindle axis. Sister kinetochores are roughly parallel with the spindle axis in the intact spindle, whereas they become tilted after cutting. We observed that the k-fibre stub became more aligned with the intact k-fibre in cells with thicker bridging fibres, which is predicted by our theory.

To experimentally explore the dependence of the tension on the location of the cut, we used our laser-cutting experiments. We found that the reduction of the interkinetochore distance was larger for cuts closer to the kinetochore, suggesting that the reduction in tension followed the same trend. This finding is consistent with the prediction from our theory that tension either remains or vanishes depending on the location of the cut with respect to the junction.

Theoretical model in three dimensions

To explain the observed shapes, we introduce a three-dimensional theoretical model for the balance of forces and torques acting on the microtubule bundles in the spindle, taking into account microtubule elastic properties. We describe a microtubule bundle as a single elastic rod of bending elasticity κ and torsional rigidity τ. The contour of elastic rod is described by its length, radial vector and torsion angle. Torsion angle describes orientation of the cross-section along the contour of the rod. The curvature and the torsion of an elastic rod are described by the static Kirchoff equation. Our model makes a link between the shape of microtubule bundles and forces and torques at the spindle poles. In the small angle approximation, static Kirchoff equation has simple analytical solutions and the twisting moment corresponds to the component of torque parallel to the long axis of the spindle. If torque has a bending moment only, there are two solutions which are both planar, the symmetric C-shape and the anti-symmetric S-shape. However, by adding a twisting moment, shapes become three-dimensional with a non-vanishing helicity in either case. Thus, our theory predicts that a twisting moment is required for a microtubule bundle to have a helical shape.

Comparison to experiments

STED super-resolution microscopy, as well as confocal microscopy, of human spindles shows that the bundles have complex curved shapes. In order to obtain a complete three-dimensional contour of microtubule bundles, we used vertically oriented spindles, which are found occasionally in a population of mitotic cells, and imaged them by confocal microscopy. In these spindles, optical sections are roughly perpendicular to the microtubule bundles, allowing for precise determination of the bundle location in each section and thus of the whole three-dimensional contour. The average helicity of the bundles with respect to the spindle axis is 1.2 $^\circ/\mu$m, which opens an interesting posibility of twist generation in the mitotic spindle..

Next, we set out to investigate the molecular mechanisms that contribute to the generation of twist in the spindle. We hypothesized that twist is generated within the bundles, by motor proteins that rotate the microtubule while walking. In vitro gliding motility studies showed

that kinesin-5 (Kif11/Eg5) switches protofilaments with biased steps towards the left. To inactivate Eg5, we treated HeLa cells with vertically oriented spindles in metaphase with S-trityl-L-cysteine (STLC), a reversible tight-binding inhibitor. We observe a change from a clockwise rotation before treatment to a more random distribution after STLC treatment.

Conclusion

We found that tension and compression coexist in a single k-fibre. In particular, the segment of the k-fibre between the junction and the kinetochore is under tension, while the bundle consisting of the segment of the k-fibre and the bridging fibre between the pole and the junction, as well as the central part of the bridge between the two junctions, are under compression. Similarly, it has been proposed that k-fibres are tensed near kinetochores and compressed near poles; however, the underlying mechanism for how the force changes direction along the k-fibre was unclear. Our model, which includes the bridging fibre as a link between sister k-fibres, provides an explanation for this counterintuitive force map because the central part of the bridge balances the forces acting at the pole and at the kinetochore, allowing coexistence of tension and compression within a single k-fibre.

By imaging the vertical HeLa and U2OS spindles, we found that the mitotic spindle is a chiral object. Chirality is an intriguing property of the biological world, present at all scales ranging from molecules to whole organisms. We find that spindle chirality cannot be explained by forces but rather by torques. Inactivation of kinesin-5 (Eg5/Kif11) abolished the chirality of the spindle, suggesting that this motor generates the helical shape of microtubule bundles. To explain the observed shapes, we introduce a theoretical model for the balance of forces and torques acting in the spindle, and show that torque is required to generate the helical shapes. We conclude that torques generated by motor proteins, in addition to forces, exist in the spindle and determine its architecture.

Sadržaj

1 Uvod **1**

1.1 Diobeno vreteno 1

1.1.1 Građa diobenog vretena 1

1.1.2 Generatori sila u diobenom vretenu 9

1.1.3 Diobeno vreteno u metafazi i ravnoteža sila 13

1.1.4 Modeli diobenog vretena u metafazi 16

1.2 Teorija elastičnosti 22

1.2.1 Male deformacije elastičnog materijala 22

1.2.2 Primjena teorije elastičnosti na tanke štapove 28

2 Premosni mikrotubuli i ravnoteža sila u metafazi **37**

2.1 Postojanje i svojstva premosnih mikrotubula 37

2.1.1 Premosno vlakno povezuje par kinetohornih vlakana 37

2.1.2 Premosno vlakno se sastoji od antiparalelnih dinamičkih mikrotubula 40

2.2 Teorijski model 43

2.2.1 Modeliranje para kinetohornih vlakana spojenih premosnim vlaknom 43

2.2.2 Rješenje modela za simetričnu geometriju u dvije dimenzije 47

2.2.3 Aproksimativni izrazi za prijelaze između specifičnih oblika u dvije dimenzije 51

2.2.4 Parametrizacija modela za vanjski oblik diobenog vretena 57

2.2.5 Rješenje modela za jedno vlakno u tri dimenzije 57

3 Teorijska predviđanja i usporedba s eksperimentom za vanjski dio diobenog vretena. **71**

3.1 Vanjski dio diobenog vretena je konveksnog oblika i pod utjecajem sila kompresije 71

3.1.1 Ulazni i izlazni parametri modela 71

3.1.2 Komplementarnost sila i momenata sila u polovima 76

3.1.3 Dozvoljeno područje parametarskog prostora 77

3.2 Sila u polu je veća ako je premosno vlakno deblje 79

3.2.1 Teorijsko predviđanje . . . 79
3.2.2 Eksperimentalna provjera . . . 80
3.3 Premosno vlakno uravnotežuje tenziju na kinetohorama . . . 83
3.3.1 Teorijsko predviđanje . . . 83
3.3.2 Eksperimentalna provjera. . . . 84
3.4 Zaključak . . . 86

4 Proučavanje unutarnjeg dijela diobenog vretena 87
4.1 Snopovi mikrotubula u diobenom vretenu su kiralni u HeLA i U2OS stanicama 87
4.2 Momenti sila objašnjavaju kiralnost diobenog vretena . . . 91
4.3 Zaključak . . . 95

5 Eksperimentalna provjera modela: unutarnji dio diobenog vretena 97
5.1 Perturbacija djelovanja molekularnog motora Eg5 . . . 97
5.1.1 Smanjenje afiniteta vezanja molekularnog motora Eg5 . . . 97
5.1.2 Smanjenje motorne aktivnosti molekularnog motora Eg5 . . . 98
5.1.3 Povećanje koncentracije molekularnog motora Eg5 . . . 99
5.2 Zaključak . . . 100

6 Zaključak i pregled 101

A Aproksimacija malih kutova 104
A.1 Ravninski oblici . . . 104
A.2 Oblici u tri dimenzije . . . 106

B Polinomijalna aproksimacija štapova 107
B.1 Sila u polu . . . 107
B.2 Položaj kinetohore . . . 109
B.3 Konkavnost štapa . . . 110

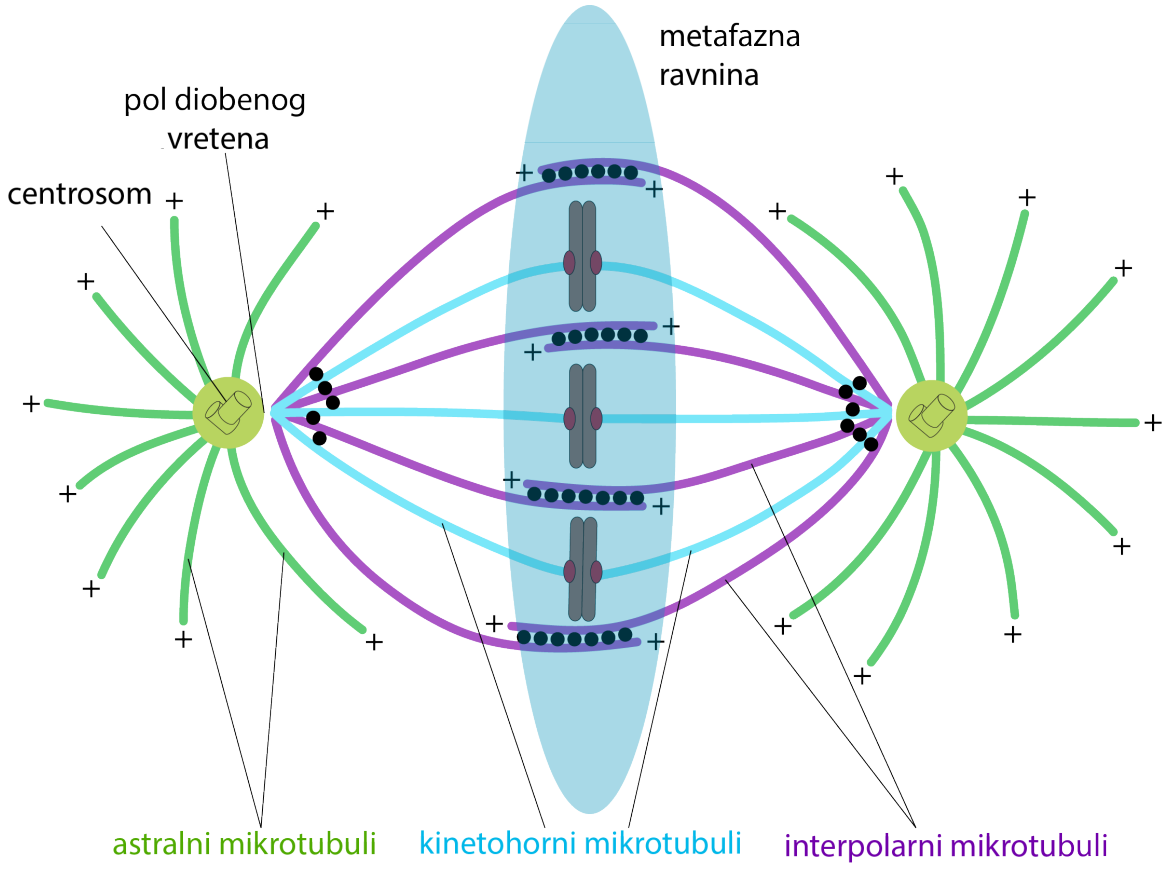
C Modul torzije snopa mikrotubula 112

1 Uvod

1.1 Diobeno vreteno

1.1.1 Građa diobenog vretena

Diobeno vreteno je organizirana, bipolarna mreža proteinskih filamenata, koja služi preciznom razdvajanju dvije kopije genetskog materijala stanice majke u dvije stanice kćeri, u procesu koji nazivamo stanična dioba. Proteinski filamenti koji grade diobeno vreteno nazivaju se mikrotubuli. Mikrotubuli su dugi i skoro savršeno ravni polimeri proteina tubulina koji posjeduju polarnost u strukturi, te im možemo definirati „+" i „-" kraj, pri čemu „+" kraj raste i skraćuje se puno brže nego „-" kraj. Da bismo razumjeli organizaciju diobenog vretena, najbolje ga je promatrati u posebnoj fazi diobe, **metafazi**, kada ono postiže najveći stupanj simetrije i stabilnosti u prostoru i vremenu, slika 1.



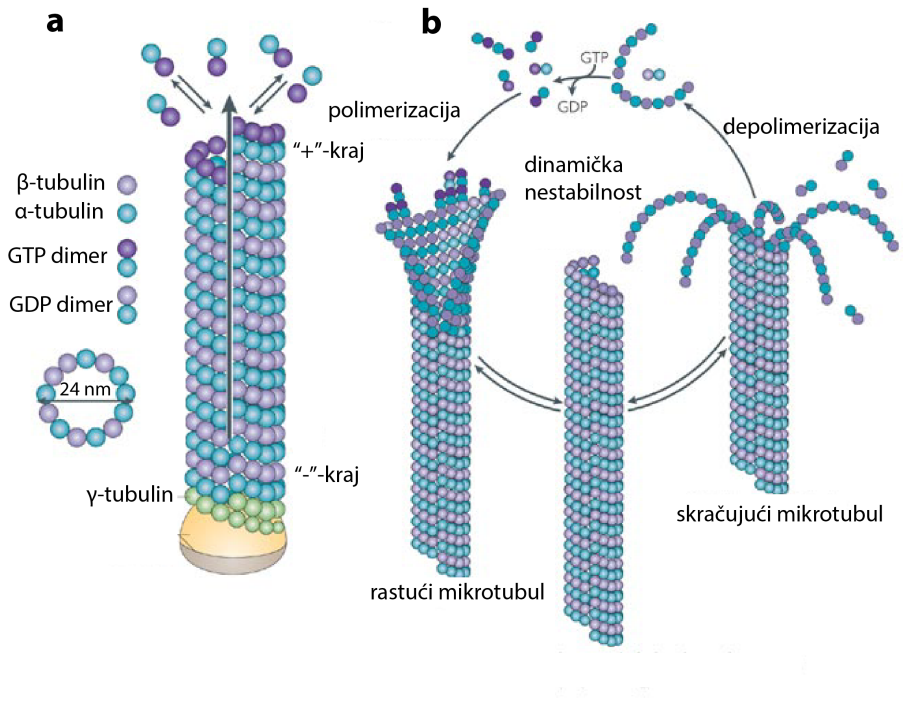
Slika 1: Građa diobenog vretena u metafazi. Prilagođeno iz [4].

Većina diobenih vretena u metafazi ima dva pola koji definiraju njihovu os simetrije rotacije. Ako se radi o životinjskim stanicama u *mitozi*, obliku diobe kod koje je krajnji ishod naslijeđivanje cjelokupnog genetičkog materijala stanice majke, polovi su smješteni u proteinskim organelama koje nazivamo centrosomi. Ako se radi o životinjskim stanicama u *mejozi*, obliku diobe kod koje je krajnji ishod naslijeđivanje polovice genetskog materijala stanice majke, centrosomi nisu prisutni. Ravnina koja prolazi kroz sredinu te osi, i okomita je na tu os, predstavlja mjesto na kojem se nalaze kromosomi, štapićaste strukture koje sadrže genetski materijal stanice. Mikrotubuli u diobenim vretenima imaju „-" krajeve u polovima, dok se „+" krajevi mogu nalaziti na raznim mjestima, po čemu mikrotubule dijelimo na tri funkcionalne podskupine, [4]: astralne, interpolarne i kinetohorne. Astralni mikrotubuli povezuju diobeno vreteno s periferijom stanice, tj. njihovi „+" krajevi završavaju na staničnoj kori, te na taj način upravljaju pozicioniranjem diobenog vretena u stanici. „+" krajevi astralnih mikrotubula mogu završavati i na površini kromosoma, te tada oni doprinose odgurivanju kromosoma od polova, za što je nužno sudjelovanje motornih proteina. „+" krajevi interpolarnih mikrotubula završavaju na drugim mikrotubulima, pri čemu oni formiraju zone antiparalelnog preklopa. U zonama antiparalelnog preklopa nalaze se motorni proteini za koje se smatra da reguliraju veličinu diobenog vretena. Za nas najzanimljivija skupina mikrotubula su kinetohorni mikrotubuli, čiji „+" krajevi završavaju na kinetohorama, specijaliziranim proteinskim kompleksima koja se nalaze na kromosomima. Oni su odgovorni za pozicioniranje kromosoma u odnosu na polove. U metafazi su sve kinetohore bi-orijentirane, tj. na svaku kinetohoru je vezano podjednako mikrotubula iz dva suprotna pola. Pokazano je da se u stanicama sisavaca mikrotubuli grupiraju u vlakna od $20-30$ mikrotubula, [5], [45], [79], [7], [73].

Građa i svojstva mikrotubula. Mikrotubuli su stanični filamenti koji posjeduju veliku otpornost na deformaciju, kao i brzu dinamiku rasta i skraćivanja. Oni grade stanični citoskelet koji se može brzo restrukturirati u procesima kao što su stanična dioba, stanična migracija i unutarstanični transport, [2]. Svi ti procesi se oslanjaju na mehaničku stabilnost citoskeleta, koja dolazi od pojedinih gradivnih elemenata, mikrotubula, aktina i intermedijalnih vlakana,

te njihovih veza. Pokazano je da termalne fluktuacije mikrotubula u živim stanicama postoje samo na skali većoj od 5 mm, [3], što se obično naziva duljina postojanosti. Diobeno vreteno ima tipičnu skalu od oko 10 µm, te iz poznavanja duljine postojanosti mikrotubula možemo tvrditi da su za njihovo svijanje u diobenom vretenu potrebne znatno veće sile od termalnih.

Mikrotubuli su dugi, tanki i šuplji cilindri, načinjeni od podjedinica tubulina, s tipičnim vanjskim promjerom od oko 24 nm. Osnovne podjedinice tubulina su građom $\alpha\beta$ heterodimeri, [8], koji se vežu longitudinalno u parovima i formiraju protofilamente. Protofilamenti se pak lateralno vežu u sloj koji je zatvoren u cilindar, slika 2, panel a). Lateralno vezivanje protofilamenata nije idealno; postoji mali pomak u longitudinalnom smjeru od oko 0.92 nm, koji nakon što vezivanja 13 protofilamenata, što je tipično za mikrotubule u stanicama sisavaca, naraste na oko 12 nm. Taj pomak odgovara ukupnoj duljini tri monomera tubulina, te se stoga protofilamenti ne vežu u heliks (uzvojnicu), već imaju diskontinuitet koji je paralelan s osi mikrotubula. Dok su mikrotubuli u stanicama sisavaca pretežito građeni od 13 protofilamenata, mikrotubuli u drugim organizmima mogu imati od $10-15$ protofilamenata. Mikrotubuli imaju izraženu strukturnu polarnost, do kojeg dolazi zbog asimetrije $\alpha\beta$ dimera i načina njihovog lateralnog vezivanja. Uloga polarnosti mikrotubula u građi diobenog vretena je već objašnjena u odjeljku 1.1, a ovdje ćemo objasniti detaljnije podrijetlo te polarnosti. Jedan kraj mikrotubula naizmjenično raste i skraćuje se većom brzinom nego drugi kraj. Taj kraj smo prethodno nazvali „+" kraj, i on se u stanici tipično nalazi na staničnoj kori, u zonama preklopa diobenog vretena, kao i na kinetohorama. Također, ranije spomenuti „-" kraj, odgovara manje dinamičkom kraju mikrotubula, i on se nalazi u polovima diobenog vretena. Na „+" kraju se nalazi β monomer, koji posjeduje afinitet za molekulu GTP (guanozin adenotrifosfat), koja nakon vezivanja može hidrolizom prijeći u GDP (guanozin adenodifosfat), što predstavlja konfiguracijsku promjenu za taj kraj mikrotubula. α monomer također ima afinitet za GTP, no nakon vezivanja GTP-a ne nastaje hidroliza, pa samim tim ni konfiguracijska promjena. $\alpha\beta$ dimeri su gusto pakirani u mikrotubule, te su površine među molekulama skoro u potpunom kontaktu, što čini mikrotubule čvrstima poput plastika.



Slika 2: Građa i dinamika mikrotubula. a) Organizacija tubulinskih dimera u mikrotubulu. b) Procesi rasta i skraćivanja mikrotubula. Preuzeto iz [9].

Također, $\alpha\beta$ dimeri ne posjeduju unutarnju zakrivljenost, što opet čini mikrotubule ravnima. Hidroliza GTP-a na β monomeru je ključna za dinamiku mikrotubula. Nakon hidrolize GTP-a, otpušta se sa mikrotubula fosfatna skupina i na β monomeru ostaje molekula GDP-a, pri čemu dio energije hidrolize ostaje sačuvan u elastičnoj napetosti mikrotubula, tj. promijenjenoj konfiguraciji „+" kraja. GDP konfiguracija dovodi do odvezivanja monomera tubulina u okolinu, a GTP konfiguracija dovodi do njihovog vezivanja, tj. mikrotubul u GTP formi raste, a mikrotubul u GDP formi se skraćuje. U slučaju da je „+" kraj mikrotubula u GTP formi izložen velikoj koncentraciji tubulina, formirati će se tzv. GTP „kapa" koja će favorizirati rast. Kako hidroliza i dodavanje novih monomera imaju konačni omjer brzina, procesi rasta i skraćivanja se izmjenjuju, a omjer broja rastućih i skraćujućih mikrotubula ovisi o omjeru spomenutih brzina. Prijelaz između rasta i skraćivanja je veoma nagao i nazivamo ga dinamička nestabilnost. Hidroliza GTP-a u GDP proizvodi unutarnju zakrivljenost pripadajućeg protofilamenta. Na taj način dolazi do „odljuštivanja" „+" kraja mikrotubula pri

skraćivanju, što je prikazano na slici 2, panel b). U živim stanicama, mikrotubuli nastaju (nukleiraju) na prstenastim kompleksima γ tubulina, koji je kod većine životinjskih stanica smješten u proteinskim strukturama centrosomima. Pri tome „-" kraj mikrotubula ostaje na centru nukleacije, a „+" kraj se proteže u prostor stanice.

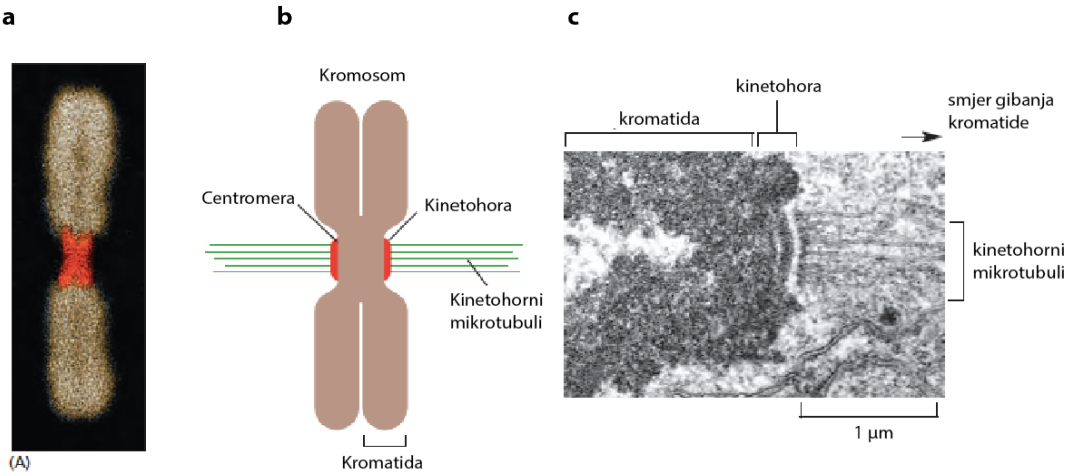
Youngov modul mikrotubula. Gittes je proveo do sada najpreciznija mjerenja koeficijenta elasticiteta mikrotubula *in vitro*, tj. njihovog Youngovog modula, i to izraslih na tubulinu izoliranom iz mozga krave, [3]. Pokazao je iz analize oblika termalnih fluktuacija mikrotubula da mikrotubuli imaju Youngov modul oko 2 GPa, slično kao tvrde plastike. To je rezultat veoma blizak mjerenjima *in vivo* Youngovog modula mikrotubula u biču spermatozoida, [10], koji je izveden iz mjerenja pomaka proizvedenih kontroliranom silom na bič. Smatra se da bi prisutnost motornih proteina na mikrotubulu *in vivo* mogla povećati njihov Youngov modul za najviše 20%, [11]. No valja dodati da bi molekule nukleotida analognog GTP-u, GMP-CPP (guanilil 5´-α,β-metilendifosfonate), koje su odgovorne za „zamrzavanje" mikrotubula u GTP stanju, mogle dvostruko povećati njihov Youngov modul, [8].

Molekularni motori. Molekularni motori su kompleksne molekule, koje pretvaraju kemijsku energiju, dobivenu iz hidrolize adenozin trifosfata (ATP-a), u mehanički rad i gibanje ili depolimerizaciju proteina, [12]. Suprotno od makroskopskih strojeva, koji rade blizu termodinamičke ravnoteže i koriste spremnike topline, nanometarski molekularni motori rade s daleko od termodinamičke ravnoteže, na skali jedne molekule, i to s velikom učinkovitošću. Molekularni motori proizvode mehanički rad preko višestrukih konformacijskih promjena tijekom interakcije s izvorom energije i mehaničkim objektima u njihovoj okolini. Usmjereni molekularni motori, kao što su kinezin, dinein i neki miozini, koračaju u diskretnim koracima duž filamenata staničnog citoskeleta, te sudjeluju u važnim procesima unutarstaničnog transporta i organizacije, kolektivnog gibanja stanice, te međusobne interakcije između stanica.

Molekularni motori posjeduju više domena, od kojih je najvažnija vrsta tzv. motorna domena ili „glava", odgovorna za vezanje i hidrolizu molekula ATP-a. Katalitička aktivnost u motornoj domeni se značajno smanjuje nakon odvezivanja molekularnog motora sa filamenta. Uz jednu ili više motornih domena, molekularni motori imaju i tzv. vezujuću domenu ili „rep". Vezujuća domena se spaja s objektom koji se transportira duž filamenta, pri čemu taj objekt

može biti i drugi filament. Molekularni motor je u stanju uzastopno hidrolizirati stotine molekula ATP-a u intervalima od 10 ms, te napraviti stotine skoro ekvidistantnih koraka duž filamenta, sve do njegovog odvezivanja. U ovom radu zanimaju nas samo molekularni motori na mikrotubulima, koje djelimo na „+" i „-" usmjerene, ovisno da li se kreću prema „+" ili „-" kraju mikrotubula. Postoje dvije glavne skupine motora koji se vežu na mikrotubule, kinezini i dineini. U ljudskim stanicama je identificirano 45 vrsta kinezina, [2]. Kinezini u pravilu imaju motornu domenu na N-terminalnom kraju, koji posjeduje slobodnu aminoskupinu, $-NH_2$, i idu prema „+" kraju mikrotubula, iako postoje i kinezini sa motornom domenom na C-terminalnom kraju, koji posjeduje slobodnu karboksilnu skupinu, $-COOH$, koji hodaju prema „-" kraju mikrotubula, kao što je kinezin-14. Kinezin-13 ima motornu domenu u sredini svog tijela, te nije pokretan, već koristi energiju ATP hidrolize za depolimerizaciju mikrotubula. Neki kinezini su homodimeri a neki heterodimeri, tj. imaju dvije iste „glave" ili dvije različite „glave". Glave su vezane preko dva duga „repa" koji su međusobno omotani. Kinezini u pravilu vežu mikrotubule jedne s drugima, iako sudjeluju i u prijenosu organela s membranama. Dineini su skupina „-" usmjerenih molekularnih motora. Strukturno su različiti od kinezina i mogu imati jednu, dvije ili tri „glave". Za nas je važna podskupina citoplazmatskih dineina koji sudjeluju u pozicioniranju centrosoma i jezgre tijekom stanične migracije i diobe, kao i formaciji diobenog vretena.

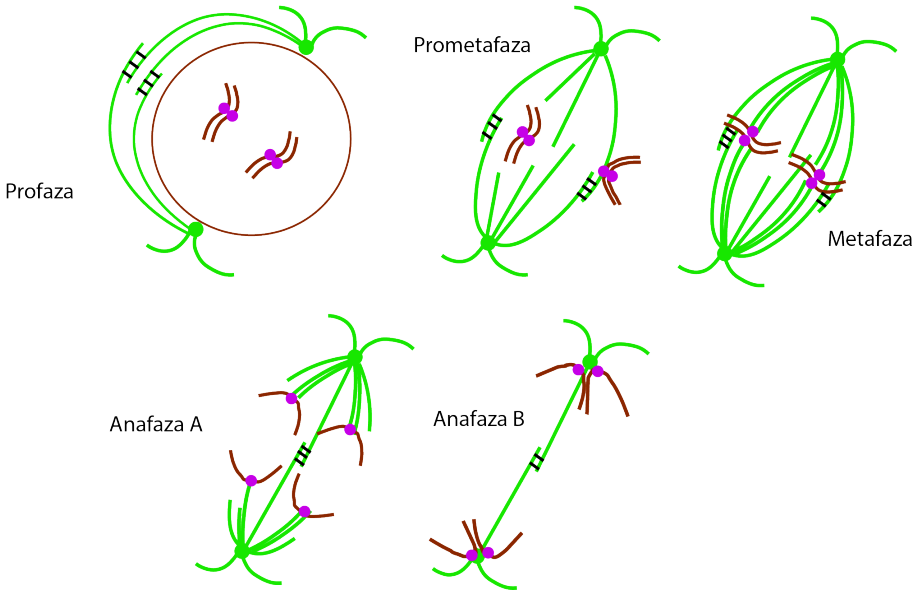
Faze diobe. Spomenuli smo već da se dioba stanice može podijeliti na četiri faze: profaza, prometafaza, metafaza i anafaza A i B, slika 4, [13]. Događaju stanične diobe prethodi dupliciranje njezinog genetskog materijala i sinteza dodatnih makromolekula, ključnih za reguliranje diobe. Taj događaj označava kraj faze prisutne između uzastopnih dioba, tzv. interfaze. Nastupa početna faza diobe koju nazivamo profaza, i tada se lanci DNA, koji čine kromatin, kondenziraju kako bi formirali štapičaste strukture koje nazivamo kromosomi. Kromosomi se na kraju procesa kondenzacije sastoje od dvije sestrinske kromatide koje nose identičan genetski materijal. Sestrinske kromatide su spojene proteinskim kompleksima kohezinima, i na njima su smješteni proteinski kompleksi kinetohore, važni za njihovo vezanje sa mikrotubulima, slika 3. Mjesto gdje se nalaze kohezini na kromosomu je ujedno i mjesto najjačeg ispreplitanja dvaju kopija genetskog materijala i taj dio kromatina se naziva centromera.



Slika 3: a) Centromera i kinetohore na fluorescencijskoj snimci kromosoma, obilježene crvenom bojom. b) Shema kromosoma i kinetohornih mikrotubula. c) Područje oko kinetohore u anafazi, snimljeno elektronskim mikroskopom. Preuzeto iz [2].

U ovom trenutku još nije prisutno diobeno vreteno. Na kraju profaze astralni mikrotubuli, koji izviru iz dvaju kopija centrosoma, putuju po površini jezgrine ovojnice i time centrosome međusobno razdvajaju. Na kraju tog putovanja dva centrosoma postaju polovi novog diobenog vretena. Ako stanica ne posjeduje centrosom, mikrotubuli će biti nukleirani drugim putem, npr. iz kinetohora i kromatina, te fokusirani u polovima pomoću motornih i vezivnih proteina, [13]. Diobeno vreteno se formira tek u prometafazi, koja započinje s pucanjem jezgrine ovojnice. U suprotnosti s malim brojem dugih mikrotubula koji izviru iz centrosoma u interfazi, u prometafazi oba centrosoma nukleiraju veliki broj kratkih i izrazito dinamičkih mikrotubula. Također, sposobnost centrosoma da nukleira mikrotubule dramatično raste. U toj fazi, glavni događaj koji se zbiva je postepeno vezanje „+" krajeva kinetohornih mikrotubula na kinetohore svih kromosoma. U tipičnim životinjskim stanicama, kinetohora može na sebe vezati $10 - 40$ mikrotubula, koji su vezivnim proteinima vezani u kinetohorno vlakno, [14]. Vezanje mikrotubula na kinetohore teži konačnom stanju gdje je svaki kromosom povezan podjednakim brojem mikrotubula sa dva suprotna pola diobenog vretena. Prvi kontakt mikrotubula s kinetohorama je često lateralan i ne uključuje „+" kraj mikrotubula, [15]. Također, u početku dolazi i do anomalnih vezivanja, gdje je jedna kinetohora vezana na dva pola ili su obje kinetohore vezane na isti pol. Smatra se da su veze kod mikrotubula

i kinetohora nestabilne za anomalna vezivanja, te da je to regulirano tenzijom u kinetohori i između kinetohora, [16]. Kod ispravnog vezivanja, tenzija na kinetohori i između kinetohora je velika, što stabilizira vezu na kinetohori i povećava afinitet za vezanje novih mikrotubula. Otprilike istovremeno s ostvarivanjem stabilnih veza polova s kinetohorama odvija se sporo i precizno gibanje kromosoma prema središnjoj ravnini diobenog vretena, što nazivamo poravnanje. Identificirano je više sila koje doprinose poravnanju kromosoma u središnjoj ravnini. Proteini prisutni na kinetohori i depolimerizacija „+" kraja mikrotubula na kinetohori uzrokuju silu tenzije na kinetohori i povlače njezinu pripadajuću kromatidu prema polu, [4]. U stanicama sisavaca postoji tzv. tok mikrotubula, gdje mikrotubuli u kinetohornom vlaknu putuju prema polu i tamo se depolimeriziraju, dok se istovremeno polimeriziraju u kinetohori, stvarajući na taj način tenziju na kinetohori, [17]. Motorni proteini na kromosomu u interakciji s astralnim mikrotubulima generiraju tzv. polarne sile izbačaja, [18], za koje se smatra da su važne za odgurivanje kromosoma prema središnjoj ravnini, [19]. Stanje u kojem su svi kromosomi približno poravnati nazivamo metafaza. Tijekom metafaze, sve tri navedene sile su uravnotežene, te su u stanicama sisavaca prisutne tzv. metafazne osilacije, gdje kromosomi kontinuirano osciliraju oko središnje ravnine, pri čemu oscilira i međusobna udaljenost kinetohora, [20]. Tijekom prometafaze u stanici se aktivira složeni mehanizam kontrole, tzv. SAC („Spindle assembly checkpoint" ili kontrolna točka diobe), [21], koji nastupa kada su kromosomi ispravno spojeni sa polovima. Jednom kada je SAC zadovoljen, veza kohezina među sestrinskim kromatidama puca. Sile koje generiraju mikrotubuli i motorni proteini pomiču svaku kromatidu prema svom polu, u procesu koji nazivamo anafaza A. Smatra se da su depolimerizacija mikrotubula u kinetohori i tok mikrotubula ključni mehanizmi za gibanje kromatida u anafazi A. Jednom kada kromatide doputuju do polova, stanica ulazi u anafazu B. U toj fazi, diobeno vreteno se izdužuje. Smatra se da su za anafazu B odgovorni motorni proteini u zonama preklopa interpolarnih mikrotubula, kao i motorni proteini na staničnoj kori, koji vuku polove preko astralnih mikrotubula. Istovremeno sa anafazom B, sužava se aktinski prsten koji dijeli gradivni materijal stanice. Konačno, u posljednjoj fazi koju nazivamo telofaza, diobeno vreteno nestaje i formira se ponovno jezgrina ovojnica u dvije stanice u nastanku. Nakon završetka diobe stanice, kromosomi gube svoju kondenziranu strukturu i prelaze ponovno u pojedinačne lance DNA.

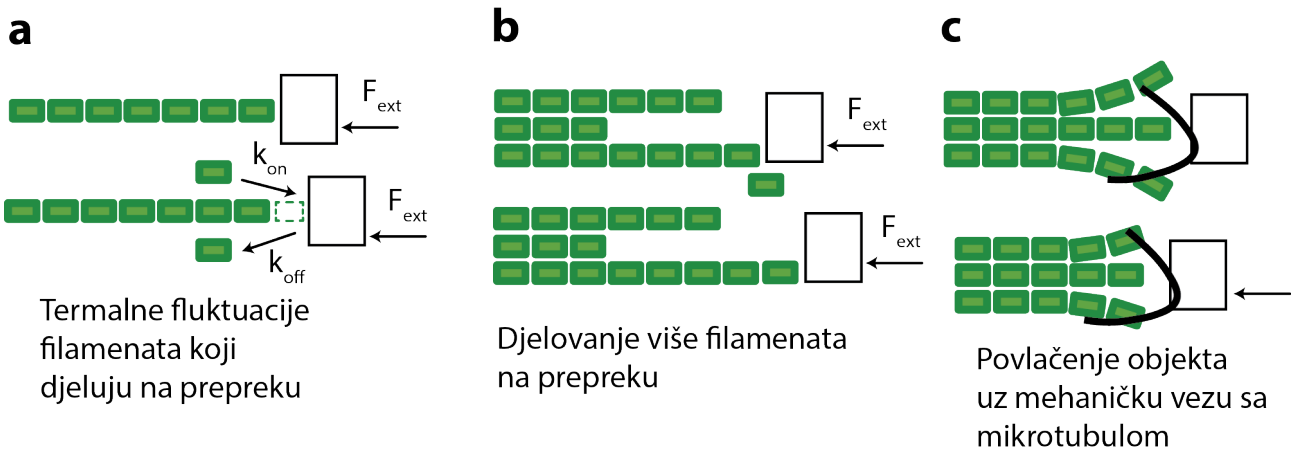


Slika 4: Faze diobe stanice u kojima je prisutno diobeno vreteno, prilagođeno iz [2]. Zelenom bojom su označeni mikrotubuli, smeđom bojom kromosomi, ljubičastom bojom kinetohore, te crnom bojom vezivni proteini.

1.1.2 Generatori sila u diobenom vretenu

Kromosomi u diobenom vretenu zauzimaju veliki dio njegovog volumena, te su podložni deformacijama. Stoga je je njihovo razdvajanje i transport potrebna precizna regulacija sila na mjestima kontakta genetskog materijala i mikrotubula. Danas je poznato da diobeno vreteno obavlja svoju funkciju putem sila koje generira polimerizacija i depolimerizacija mikrotubula, kao i djelovanje molekularnih motora, podijeljenih na kinezine i dineine, [25]. Mikrotubuli u diobenom vretenu naizmjence rastu i skraćuju se, te pri tome koriste energiju oslobođenu u GTP hidrolizi, generirajući pri tome sile na organele s kojima su u kontaktu. S druge strane, molekularni motori koriste energiju oslobođenu u ATP hidrolizi te generiraju sile putem relativnog pomicanja susjednih mikrotubula, ili mikrotubula i drugih staničnih organela poput kinetohora, kromosoma i stanične kore, [28], [30]. Pasivni molekularni motori, tj. oni koji međusobno vežu, ali ne pomiču stanične strukture, efektivno povećavaju trenje aktivnih molekularnih motora. Molekularni motori ujedno mogu i regulirati rast i skraćivanje mikrotubula, što je temeljito istraženo na kinetohorama i u polovima, [31].

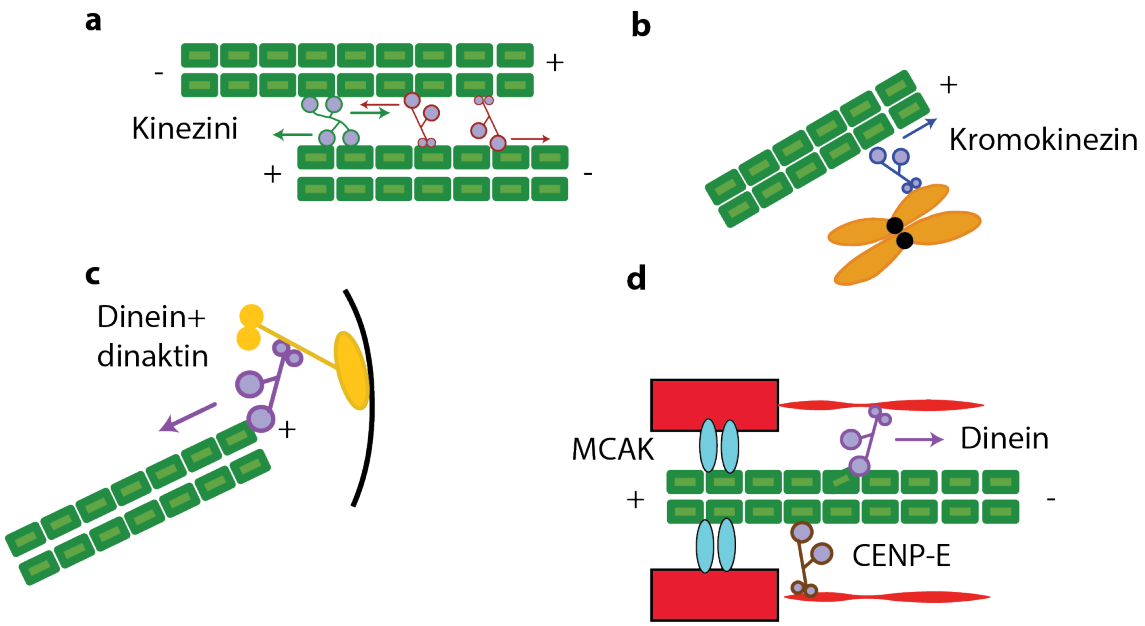
Polimerizacija i depolimerizacija mikrotubula stvara sile. Mikrotubuli koji polimeriziraju, rastu u duljinu, i to dodavanjem $\alpha\beta$ dimera tubulina iz okoline. Pri ugradnji jednog takvog dimera, mikrotubul istovremeno dobiva energiju od $5 - 10\,\mathrm{k_bT}$. Iz toga možemo vidjeti da mikrotubul koji naraste 8µm, proizvede silu od oko 50pN na objekt kojeg gura tijekom procesa polimerizacije, slika 5. Pri gubitku svakog dimera, tj. depolimerizaciji, iz sustava se oslobađa energija od $5 - 10\ \mathrm{k_bT}$. U oba ta procesa troši se energija pohranjena u konfiguraciji molekule GTP-a, te stoga oba procesa mogu vršiti rad na staničnim strukturama. Prvi kvantitativni eksperimenti koji istražuju rad mikrotubula su izvedeni na *in vitro* mikrotubulima koji su gurali stanične organele, [32]. Uvriježeno je da se dinamika mikrotubula opisuje tzv. „Brownian ratcheting" mehanizmom, [33], što je prikazano na slici 5, panel a). U tom mehanizmu termalne fluktuacije dozvoljavaju stohastičko dodavanje novih dimera tubulina, i to bez obzira da li mikrotubul raste slobodno ili gura neki objekt. Amplituda termalnih fluktuacija se smanjuje kako sila kojom objekt djeluje na mikrotubul raste, stoga učestalost dodavanja novih dimera tubulina pada i mikrotubul raste sporije. Kod određene kritične sile, rast mikrotubula se posve zaustavlja. U slučaju da snop mikrotubula djeluje polimerizacijom na objekt, neki od mikrotubula u svežnju neće moći proizvesti rad, jer u svakom danom trenutku rad proizvodi onaj mikrotubul koji je u kontaktu s objektom, slika 5, panel b). Stoga generiranje sile na objekt neće biti optimalno. Sile koje mikrotubul može generirati na objekt depolimerizacijom nisu toliko detaljno istraživane *in vitro* kao sile uslijed polimerizacije, s obzirom da je za njihovo ostvarivanje potrebna mehanička veza između mikrotubula i objekta, [34], slika 5, panel c). Poznato je da rast i skraćivanje mikrotubula značajno doprinosi generiranju sila na kinetohorama, [1], [28], [34]. Primjerice, precizno reguliran prijelaz između rasta i skraćivanja mikrotubula u metafazi uzrokuje oscilacije kinetohora oko metafazne ravnine, [35], pri čemu se dinamika mikrotubula spreže sa djelovanjem molekularnih motora dineina na mikrotubul u kinetohori. Mehanička veza mikrotubula i kinetohore je frontalnog tipa, tj. „+" kraj mikrotubula je najbliži kinetohori, na koju se veže Ndc80 molekularnim kompleksom, [36]. U stanicama kvasca, dinamika mikrotubula direktno utječe na pozicioniranje jezgre pred diobu, pri čemu se mikrotubuli koji rastu iz nukleacijskog mjesta na jezgri opiru o staničnu membranu, [37], ili budu vezani na membranu putem dineina koji ih vuku, [38].



Slika 5: Mikrotubuli kao generatori sila. a) Polimerizacija mikrotubula stvara silu. b) Djelovanje snopa mikrotubula na objekt. c) Depolimerizacija mikrotubula stvara silu. Prilagođeno iz [34]

Važnost dinamike mikrotubula u kinetohorama je osobito naglašena u anafazi. U anafazi A nastupa tzv. mehanizam „Pac-Man", [26], [27], pri čemu molekularni motori na kinetohorama induciraju jaku depolimerizaciju na „+" krajevima mikrotubula, što u konačnici rezultira transportom kromosoma prema polovima. Uz ovaj mehanizam, u anafazi je važan i tzv. „treadmilling" ili tok podjedinica tubulina, gdje je depolimerizacija u polovima spregnuta s pomicanjem mikrotubula prema polovima, pri čemu je pomicanje uzrokovano djelovanjem molekularnih motora u polovima [39], [17], [29].

Molekularni motori stvaraju sile. Djelovanje molekularnih motora u diobenom vretenu se očituje relativnim pomicanjem mikrotubula i staničnih struktura, [4]. Smatra se da prostorna i vremenska organizacija diobenog vretena ovisi o antagonizmu sila koje proizvode motori koji hodaju prema „+" kraju i prema „-" kraju mikrotubula, [25]. Primjer takvih antagonističkih motora su kinezin-5 („+" motor) i kinezin-14 („-" motor), pri čemu su oba motora prisutna u zonama preklopa. Pokazano je *in vitro* da ta dva motora mogu jedan drugome poništiti djelovanje, [40], te je na temelju toga postavljena hipoteza da antagonizam ta dva motora određuje dinamiku polova, tj. duljinu diobenog vretena tijekom diobe, [25].



Slika 6: Molekularni motori, njihovo djelovanje i njihov položaj u diobenom vretenu, prilagođeno iz [4]. a) Kinezini razmiču i primiču relativno mikrotubule. b) Kromokinezini pomiču kromatidu po mikrotubulima. c) Dinein/dinaktin kompleks vuče mikrotubul prema staničnoj kori. d) CENP-E vuče kinetohoru prema „+" kraju, dinein vuče kinetohoru prema polu, dok MCAK depolimerizira mikrotubul u kinetohori.

Tok podjedinica tubulina, ili „treadmilling", te djelovanje kinezina-5 u zonama preklopa, ističe se kao glavni čimbenik u produljivanju diobenog vretena u anafazi B, [41]. Poznato je da dinein generira sile koje vuku astralne mikrotubule prema staničnoj kori, [4], te na taj način doprinosi pozicioniranju i duljini diobenog vretena, [28]. Jedno od ključnih mjesta u diobenom vretenu gdje se regulira gibanje kromosoma je kinetohora, gdje su prisutni dinein („-" motor) koji vuče kromosome prema polu i kinezin CENP-E („+" motor) koji transportira kinetohoru duž mikrotubula dok se ne postigne frontalno vezivanje kinetohore na mikrotubul, [4]. Osobito je važna regulacija rasta i skraćivanja mikrotubula na kinetohorama, osobito tijekom metafaznih oscilacija, koja se ostvaruje molekularnim motorom MCAK, [42]. Gibanje kromosoma tijekom diobe reguliraju još i tzv. polarne sile izbačaja, koje nastaju tako da se molekularni motori kromokinezini, vezani na površinu kromatide, pomiču po astralnim mikrotubulima, [43]. Te sile deformiraju kromatide, tako da se one okreću prema sredini diobenog vretena. Pokazano je da polarne sile izbačaja značajno doprinose centriranju kromosoma u

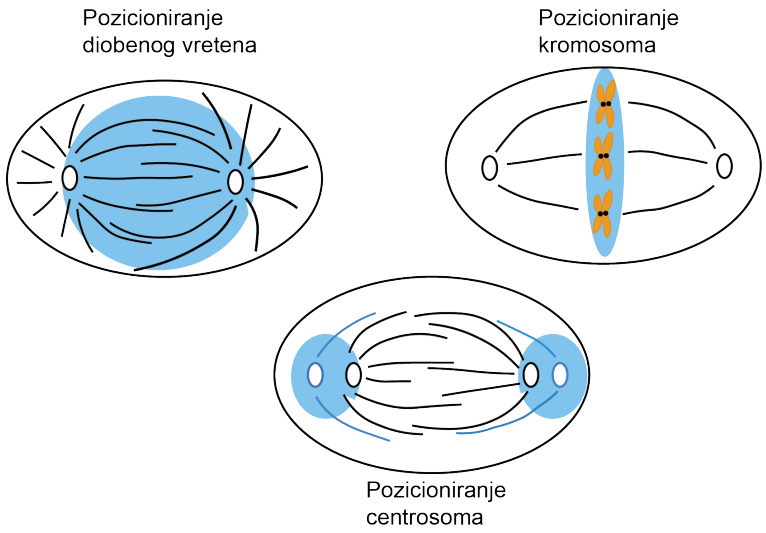
metafaznoj ravnini, [36], te da su odgovorne za centriranje u monopolarnim vretenima, kao i oscilacije kromosoma, [44].

U konačnici, nije iznenađujuće da diobeno vreteno koristi tako raznolike motore i mehanizme za ostvarivanje svog cilja, stanične diobe, slika 6. Međuzavisnosti i kolektivni efekt svih prisutnih motora, te njihova sprega s depolimerizacijom, vjerojatno omogućuju da sile koje razdvajaju genetički materijal budu izrazito precizne tijekom cijelog trajanja diobe. Možemo spekulirati da diobeno vreteno ima mogućnost nadopunjavanja raznih generatora sila u slučaju da faktori okoline djeluju nepovoljno po diobu.

1.1.3 Diobeno vreteno u metafazi i ravnoteža sila

Diobeno vreteno u metafazi je statički objekt. Metafaza je vremenski isječak diobe u kojem kromosomi približno zadržavaju položaj i oblik u središnjoj (metafaznoj) ravnini, te je postignuta stabilna udaljenost između polova, dok cijelo diobeno vreteno zadržava stabilni položaj relativno prema stanici, [28]. Zbog toga je metafaza kao vremenski stabilno i prostorno simetrično stanje idealna faza diobe za istraživanje ravnoteže sila i njihovih generatora u diobenom vretenu, te se diobeno vreteno u metafazi može modelirati kao statički objekt. U ovom radu ćemo modelirati diobeno vreteno u metafazi i kao makroskopski objekt, unatoč tome što posjeduje zrnatu molekularnu strukturu. Sile prisutne u metafazi se mogu podijeliti na aktivne (uzrokovane molekularnim motorima), pasivne (uzrokovane trenjem) i sile reakcije (uzrokovane elastičnim odgovorom materijala). S obzirom da je diobeno vreteno u metafazi približno statičko, lokalno mora zbroj svih tih sila iščezavati. U ovom radu baviti ćemo se prvenstveno stanicama sisavaca, za koje je tipično da u metafazi stvaraju svežnjeve mikrotubula. Kinetohorni mikrotubuli se grupiraju u grupe od $10 - 30$ mikrotubula, takozvana kinetohorna vlakna („k-fibres"), koji se vežu na jedinstvenu kinetohoru, [45] i kontinuirano protežu do polova. Interakcije između kinetohornih vlakana su slabe, osim u području polova, gdje se kinetohorna vlakna isprepliću, [46], [47]. Također je pokazano da se u stanicama sisavaca inerpolarni mikrotubuli grupiraju u interpolarna vlakna koja sačinjavaju $2 - 6$ mikrotubula, [7]. Smatra se da su ona nužna za bipolarnost diobenog vretena, tj. za održavanje konačne udaljenosti između polova, [28]. U stanicama sisavaca astralni mikrotubuli su slabo zastupljeni i nije primijećeno njihovo grupiranje, [28]. Polimerizacija,

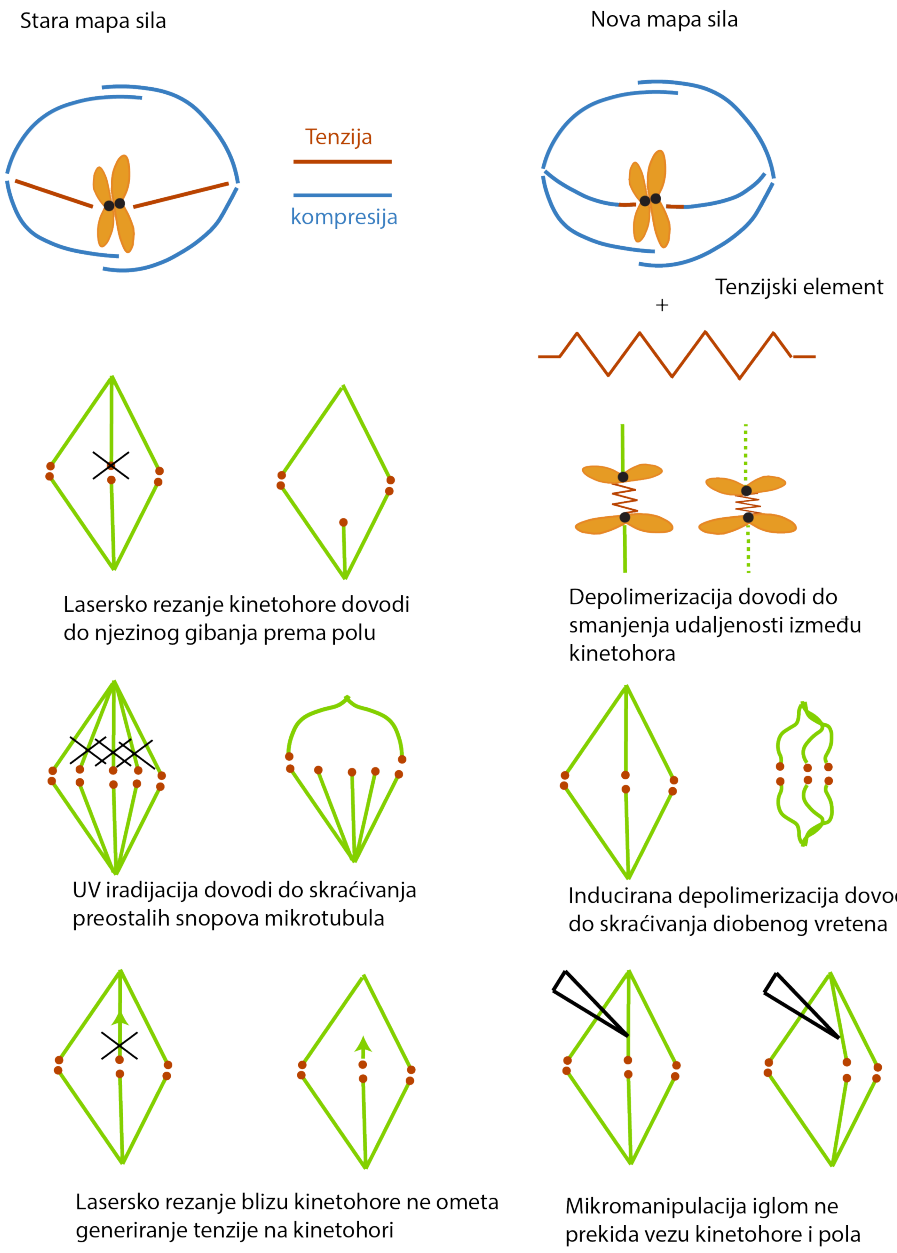
depolimerizacija i pomicanje svih vlakana se u metafazi mora međusobno dokinuti, što predstavlja fizikalni problem za diobeno vreteno, te je goruće pitanje kako se taj uvjet ostvaruje u živoj stanici, slika 7.



Slika 7: Prostorna organizacija diobenog vretena u metafazi, prilagođeno iz [28]

Mapa sila u metafaznom diobenom vretenu i paradoks ravnoteže sila. Iako je danas poznat velik broj molekularnih motora, kao i mikroskopska dinamika molekularnih motora i mikrotubula, veoma se malo zna o tome kako se oni uklapaju u makroskopsku sliku diobenog vretena. Niz eksperimenata pomoću kojih se pokušalo odgovoriti na to pitanje uključuje mjerenje makroskopskih sila. U idućim paragrafima ćemo spomenuti i glavne teorijske modele kojima se uspješno opisalo diobeno vreteno, na makroskopskoj skali. Jedan od ciljeva današnje biofizike stanične diobe je konačna mapa sila diobenog vretena. Takva mapa se zapravo sastoji od informacije o tome koji dijelovi diobenog vretena su pod silama tenzije a koji pod silama kompresije. Uz eksperimente perturbacije molekularnih motora u diobenom vretenu, jako su važni i eksperimenti mehaničke perturbacije diobenog vretena, kao što su npr. eksperimenti rezanja (ablacije). Danas je poznato da su kinetohorna vlakna u blizini kinetohora pod silama tenzije, što je potvrđeno eksperimentom gdje je laserski rezana jedna od kinetohora, nakon čega je opaženo gibanje njezine sestrinske kinetohore prema polu, [48].

Tu činjenicu su potvrdili i eksperimenti u kojima je bilo kemijski inducirano depolimeriziranje kinetohornih mikrotubula, uslijed čega je došlo do smanjenja udaljenosti između sestrinskih kinetohora, [49]. Postavlja se pitanje kako diobeno vreteno može uravnotežiti silu tenzije na kinetohorama, tj. gdje se pojavljuje nedostajuća sila kompresije u mapi sila diobenog vretena. Do sada se na to pokušalo odgovoriti uzimajući u obzir opažanja oblika snopova mikrotubula kod nekih organizama, koja ukazuju na ravna kinetohorna vlakna i zakrivljena interpolarna vlakna, [50]. Iz oblika snopova mikrotubula izveden je zaključak da interpolarna vlakna preuzimaju na sebe silu kompresije, te tako uravnotežuju silu tenzije na kinetohorama. Takva mapa sila se danas uvriježeno smatra točna za većinu metafaznih diobenih vretena, slika 8, panel A. Ključna predikcija ove mape sila, nazvane još i „tensed k-fibers map" je produživanje diobenog vretena nakon rezanja jednog ili više kinetohornih vlakana. Međutim, takvi eksperimenti nisu pokazali jednoznačne rezultate, [51], [52]. Eksperimenti inducirane depolimerizacije interpolarnih vlakana u ekstraktu jajašaca žabe (*Xenopus Laevis*), su pokazali da dolazi do skraćivanja preostalih kinetohornih vlakana, [53]. Također, nova opažanja da i kinetohorna vlakna imaju zakrivljen oblik, koji je približno stabilan tijekom metafaznih oscilacija, navela su na znanstveno pitanje o tome što stabilizira njegovu zakrivljenost i samim time definira smjer metafaznih oscilacija. U prijašnjim radovima na to se pokušalo odgovoriti uvođenjem hipotetskog tenzijskog elementa unutar diobenog vretena, [28], [53]. Taj tenzijski element bi objasnio opažen konveksni oblik kinetohornih vlakana i interpolarnih vlakana. Ako pretpostavimo postojanje takvog tenzijskog elementa, možemo tvrditi da su kinetohorna vlakna i interpolarna vlakna pod silom kompresije, te još točnije, da sila kompresije djeluje u polovima. Kao kandidat za hipotetski tenzijski element je predložena tzv. „molekularna matrica" koja bi se sastojala od proteina kao što su NuMa, [54], Skeletor, [55], i poly(ADP-ribose), [56], te granica endoplazmatskog retikuluma [57]. U ovom radu ćemo, kao alternativu „molekularnoj matrici", odgovoriti na pitanje uravnoteženja sile tenzije na kinetohorama uvođenjem novog strukturalnog elementa, premosnog vlakna.



Slika 8: Pregled rezultata dosadašnjih eksperimenata koji objašnjavaju mapu sila u metafaznom diobenom vretenu, prilagođeno iz [28].

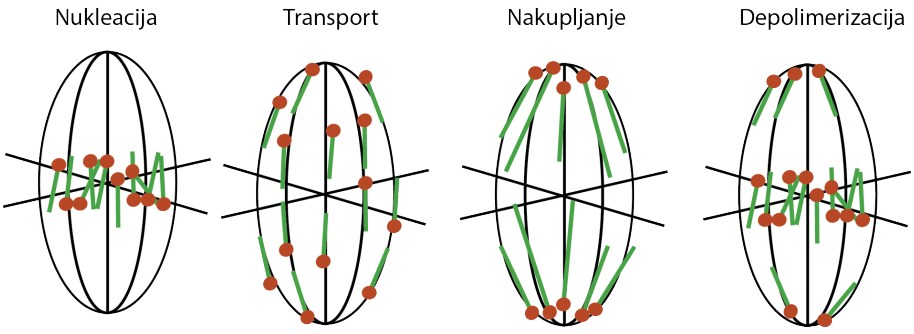
1.1.4 Modeli diobenog vretena u metafazi

U ovom odjeljku ćemo dati pregled glavnih modela koji makroskopski opisuju diobeno vreteno u metafazi. Pri tome valja napomenuti da se „Slide-and-cluster" model smatra reprezentativnim za opis metafaze u mejozi žabe *Xenopus Laevis,* [58], [59], model tekućeg kristala

reprezentativan za opis metafaze u istom organizmu, ali u mitozi, [60], [61], dok se model baziran na teoriji elastičnosti smatra reprezentativan za opis metafaze u mitozi vinske mušice *Drosophila Melanogaster*, [62]. Iako se radi o bitno različitim modelnim organizmima, sva tri modela opisuju metafazu i na taj način odgovaraju na ključno pitanje makroskopskog opisa sila u diobenom vretenu. Također valja spomenuti da je za modelni organizam vinske mušice napravljen model koji opisuje vremensko izmjenjivanje različitih tipova molekularnih motora kroz sve faze diobe, [25]. No da bismo dobro razumjeli makroskopsku mapu sila u cijeloj diobi za stanice sisavaca, važno je dobro razumjeti kako one djeluju u metafazi. Opis sila u metafazi se jednostavno svodi na prostornu mapu tenzije i kompresije, zbog toga što je tada diobeno vreteno približno statički objekt.

„Slide-and-cluster" model Ovim modelom je opisana metafaza diobenog vretena žabe u mejozi, kao i proces samo-organizacije tog diobenog vretena u prometafazi, [58], [59]. Model u sebi sadržava četiri molekularna procesa: nukleaciju mikrotubula u blizini kromosoma, relativno razmicanje susjednih mikrotubula, nakupljanje mikrotubula u polovima i stohastičko skraćivanje mikrotubula, slika 9. Nakon nukleacije, molekularni motori prenose dinamičke mikrotubule prema polovima, gdje se oni usporavaju i nakupljaju, dok novi mikrotubuli nastaju u metafaznoj ravnini. Kao kandidat za molekularni motor koji relativno razmiče mikrotubule u blizini kromosoma, predložen je kinezin-5, usmjeren prema „+" kraju, dok je za molekularni motor koji uzrokuje nakupljanje mikrotubula u polovima predložen dinein vezan u dinein/dinaktin kompleks. Valja napomenuti da molekularni motor koji uzrokuje nakupljanje mikrotubula u polovima ujedno i doprinosi njihovom prenošenju prema polovima s obzirom da se radi o molekularnom motoru koji je uspmjeren prema „-" kraju. Model uspješno predviđa tok mikrotubula prema polovima, stabilnu duljinu diobenog vretena te promjenu duljine diobenog vretena nakon perturbacije gore navedenih motora. Model također robusno predviđa bipolarna diobena vretena za široko područje parametara, te također predviđa da fokusiranost polova značajno ovisi o omjeru aktivnosti dva motora: ako dominiraju „+" motori, polovi su raspršeni, ako pak dominiraju „-" motori, polovi su oštro definirani. Iz modela izlazi da je tipična duljina diobenog vretena je zadana sa umnoškom srednjeg života mikrotubula i srednje brzine mikrotubula. U prvom „slide-and-cluster" modelu nije uključena dinamika

„+” krajeva mikrotubula, [58]. Noviji model, [59], sadrži i taj efekt, no kako bi model mogao reproducirati bipolarno vreteno, valjalo je u njega uključiti i nukleaciju duž cijelog volumena diobenog vretena. U suprotnom, model predviđa isključivo monopolarna vretena. Novije istraživanje, [63], pokazuje kako ravnoteža sila između kinezin-5 i kinezin-14 motora nije dostatna za formiranje diobenog vretena stabilne duljine. Motivirani tim saznanjima u model „slide-and-cluster” je uključen transport „-” motorima (kandidat NuMa i dinein kompleks) i depolimerizacija u polovima (kandidat kinezin-13). Novi, prošireni „slide-and-cluster” model realiziran je kao numerička simulacija u dvije dimenzije, te predviđa stabilno diobeno vreteno. Model daje predviđanje za oblik diobenog vretena nakon dodavanja monastrola, spoja koji smanjuje motornu aktivnost kinezina-5, te predviđa smanjenje udaljenosti među polovima i smanjenje toka mikrotubula. Model također predviđa raspršenje polova pri induciranom smanjenju transporta mikrotubula prema polovima, što je prethodno viđeno u eksperimentu, [64]. U konačnici, pokazano je da formiranje polova i stabilna duljina diobenog vretena ovisi o jednostavnom mehanizmu negativne povratne veze: razmicanje polova uzrokuje gubitak mikrotubula u polovima zbog depolimerizacije na „-” krajevima, sve dok ta depolimerizacija ne bude uravnotežena tokom mikrotubula prema polovima.



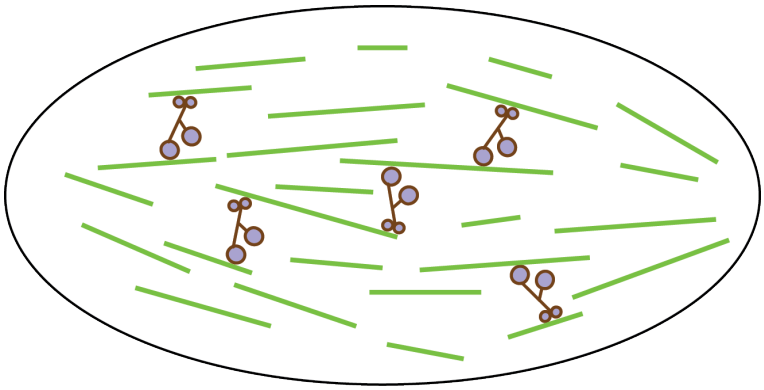
Slika 9: „Slide-and-cluster” model, prilagođeno iz [58]. Zelenom bojom su označeni mikrotubuli, dok su crvenom bojom označeni molekularni motori koji relativno razmiču i prenose mikrotubule prema polovima. Ravne crne linije predstavljaju prostor nukleacije, dok zakrivljene crne linije predstavljaju smjer toka mikrotubula.

Model tekućeg kristala Model tekućeg kristala je uspješno primijenjen na modelni organizam žabe *Xenopus Laevis*, i to na metafazu u mitozi, [60]. Specifičnost tog diobenog

vretena jest izostanak dobro definiranih snopova mikrotubula, kakva tipično postoje u diobenim vretenima sisavaca. Naprotiv, u diobenom vretenu žabe postoji kontinuirani tok kratkih mikrotubula koji spaja kinetohore i polove. Morfologija takvih diobenih vretena zaista vizualno podsjeća na tekuće kristale. Dio parametara ovog složenog modela je određen iz oblika prostorno-vremenskih korelacija fluktuacija gustoće, usmjerenosti i iz njih izvedenog naprezanja mikrotubula.

Iako su mikrotubuli duž diobenog vretena geometrijski međusobno poravnati, njihova polarnost se prostorno mijenja, [61]. Stoga se uvode u model dva polja, polje usmjerenosti i polje polarnosti, pri čemu je polje usmjerenosti konstantno a polje polarnosti ovisi o djelovanju motora i sprezanju sa tokom mikrotubula prema polovima. Tako postavljena teorija zapravo opisuje kolektivno ponašanje mikrotubula koji su usmjereni neovisno o svojoj polarnosti, te su podložni toku, rastu i skraćivanju. Jednadžbe za promjene navedenih polja u vremenu riješene su u hidrodinamičkoj aproksimaciji. Uz jednadžbe dinamike za polja, upotrijebljena je i jednadžba ravnoteže sila, gdje je ukupno naprezanje na infinitezimalni volumen mikrotubula jednako zbroju reaktivnog, aktivnog i disipativnog naprezanja. Sva tri naprezanja su vezana uz polje usmjerenosti kao pripadajuću deformaciju.

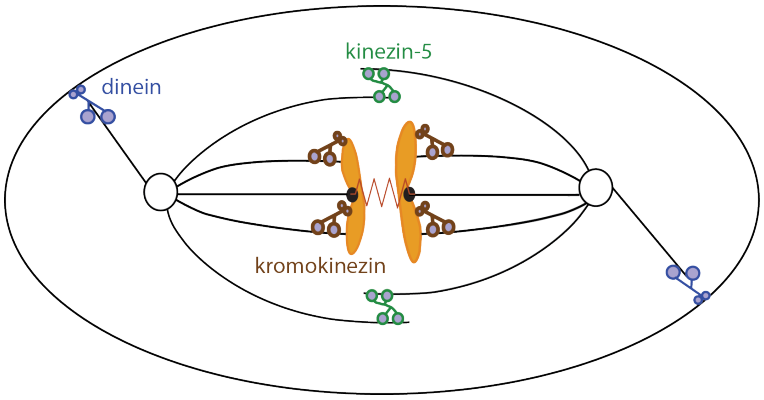
Ako su gibanja mikrotubula uzrokovana lokalnim međudjelovanjima, očekuje se sprezanje polja usmjerenosti i gustoće, što su potvrdili u vlastitim eksperimentima. Iako model ima samo 6 parametara, uspio je dobro predvidjeti 8 korelacijskih funkcija (gustoća-gustoća, usmjerenje-usmjerenje, usmjerenje-gustoća i naprezanje-naprezanje, u vremenu i prostoru), za što bi valjalo imati minimalno 16 parametara. Opažen je i plato na malim valnim duljinama u prostornim korelacijama gustoće, koji upućuje na važnu ulogu rasta i skraćivanja mikrotubula u tom diobenom vretenu. Također je pokazano da model tekućeg kristala može objasniti morfologiju diobenog vretena. Uz pretpostavku da je diobeno vreteno elipsa konstante gustoće i volumena, model daje raspodjele polarnosti i usmjerenja mikrotubula u tom volumenu, kao i omjer glavnih osi elipse, slika 10, što su uspješno potvrdili vlastitim eksperimentima.



Slika 10: Model tekućeg kristala, prilagođeno iz [61]. Zelenom bojom su označeni mikrotubuli, dok su sivom bojom označeni molekularni motori i vezivni proteini.

Modeliranje elastičnih sila u diobenom vretenu U ovom modelu su snopovi mikrotubula opisani kao tanki elastični štapovi, te je njihov oblik opisan Euler-Bernoullijevom jednadžbom iz klasične teorije elastičnosti, koja je specijalni slučaj statičke Kirchoffove jednadžbe, uvedene u poglavlju 1.2. Model iz [62] uzima u obzir sile koje generiraju motori kinezina-5 u antiparalelnoj zoni, [65], koje oblikuju interpolarna vlakna, zatim sile koje generiraju kromokinezini na kromatidama, koje oblikuju kinetohorna vlakna, te sile kojima dineini vuku astralne mikrotubule, slika 11. U tom ovom modelu sve navedene sile uravnotežuju tenziju na kinetohorama i objašnjavaju cjelokupni oblik diobenog vretena vinske mušice. Promatrane su dvije vrste grupiranja mikrotubula u snopove (vlakna): jako vezivanje, gdje se modul svijanja snopa skalira prema elasticitetu jednog mikrotubula s N^2 i slabo vezivanje, gdje se modul svijanja snopa skalira prema elasticitetu jednog mikrotubula s N. Ovdje je N broj mikrotubula u vlaknu. U režimu jakog vezivanja poprečni presjek snopa se dobiva skaliranjem poprečnog presjeka jednog mikrotubula sa N, te se iz njegovog oblika dobiva modul svijanja, zadan u jednadžbi (1.2.41), koji se tada skalira s N^2. U režimu slabog vezivanja, svaki mikrotubul se savija neovisno o njegovim susjedima, te se sile i momenti koji su potrebni za savinuti N mikrotubula skaliraju sa N. Također su razmatrani rubni uvjeti učvršćenog i pivotirajućeg kinetohornog vlakna u polu. U oba slučaja se pretpostavlja da je kinetohorno vlakno učvršćeno na kromosomu. Teorijskim istraživanjem parametarskog prostora pokazano je da nije moguće dobiti konveksne oblike kinetohornih vlakana za realističan raspon

sila u polovima ako je vlakno u polu pivotirajuće. Također se dobiva da se efektivno sva kinetohorna vlakna u diobenom vretenu ponašaju kao opruga čija je konstanta elastičnosti $K = 30$ pNμm^2. Oblici interpolarnih vlakana su opisani analitički za slučaj infinitezimalno male zone preklopa, tj. velikih motornih sila i numerički za slučaj velike zone preklopa, tj. malih motornih sila. Pokazano je da se za male motorne sile inerpolarna vlakna ponašaju efektivno kao opruga čiji je konstanta elastičnosti $K = 10$ pNμm, te je neovisna o jačini motorne sile. Rezultati modela pokazuju da je potrebno generirati oko 10 pN po interpolarnom vlaknu od strane kinetohornih vlakana da bi se uravnotežilo diobeno vreteno. Za drugu klasu rješenja, kada su prisutne velike motorne sile, interpolarna vlakna se ponašaju kao efektivna opruga konstante elastičnosti $K = 30$ pNμm^2. Model predviđa da perturbacija motora u zoni preklopa utječe na omjer osi diobenog vretena, te da su i kinetohorna i interpolarna vlakna vjerojatno učvršćena u polovima, s obzirom na opažene konveksne oblike. Konačni zaključak modela je da je konstanta elastičnosti opruge diobenog vretena vinske mušice, sastavljena od nekoliko desetaka interpolarnih i kinetohornih vlakana reda veličine $K = 100$ pNμm^2, što čini diobeno vreteno u metafazi mehanički robusnim na fluktuacije u motornim silama. Autori spekuliraju da je $N \approx 10$ optimalni broj mikrotubula po jednom svežnju koji omogućuje mehaničku stabilnost pojedinog vlakna i istovremeno maksimizira broj vlakana u vretenu, što pak omogućuje mehaničku stabilnost ukupnog vretena.



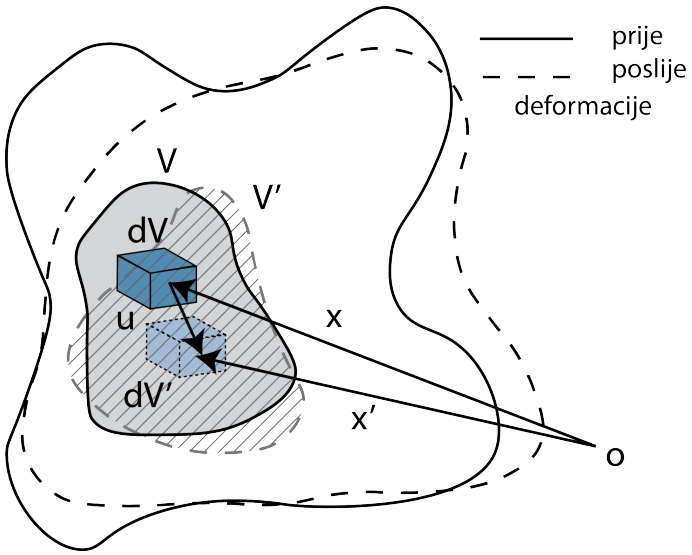
Slika 11: Primjena teorije elastičnosti na diobeno vreteno. Crnom bojom su označeni kinetohorni, interpolarni i astralni mikrotubuli. Narančastom bojom je označen kromosom. Molekularni motori koji su sadržani u modelu su kinezin-5 u zonama preklopa, kromokinezin na kromatidama i dinein/dinaktin kompleks na staničnoj kori. Prilagođeno iz [62].

1.2 Teorija elastičnosti

1.2.1 Male deformacije elastičnog materijala

Sustav koji proučavamo u ovom radu, a to su snopovi mikrotubula u diobenom vretenu, može se promatrati kao čvrsto, kontinuirano tijelo, na koji se u najopćenitijem obliku može primijeniti teorija elastičnosti. Teorija elastičnosti se bavi elastičnim deformacijama čvrstih tijela. Svako tijelo koje je u stanju elastične deformacije, vratit će se u svoje prvobitno, nedeformirano stanje nakon prestanka djelovanja vanjskih sila i momenata sila. Postoje i deformacije kod kojih to nije slučaj (plastične deformacije), no njima se ovdje nećemo baviti. U ovom odjeljku ćemo raspraviti osnove teorije elastičnosti za proizvoljna čvrsta i izotropna tijela, koja ne moraju nužno imati oblik tankih štapova kao što ih prirodno imaju snopovi mikrotubula. Kada na jedno takvo tijelo djelujemo vanjskim silama i momentima sila, ono će ući u stanje deformacije, tj. promjene oblika i volumena u svakom njegovom dijelu. Stupanj deformacije možemo definirati preko vektora pomaka $\mathbf{u}$ tj. promjene u položaju $\mathbf{x}$ infinitezimalnih volumena tijela dV prije i nakon djelovanja vanjskih sila i momenata sila, kada ga označavamo sa $\mathbf{x}'$,

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}) = \mathbf{x}' - \mathbf{x}. \tag{1.2.1}$$



Slika 12: Teorijski prikaz geometrije tijela prije i poslije elastične deformacije.

Infinitezimalni volumeni prije i poslije deformacije, vektori njihovih položaja, kao i vektor pomaka prikazani su na slici 12. Na istoj slici prikazani su i volumeni unutar tijela prije i poslije deformacije, V i V', koji će biti potrebni u daljnjem računu. Kada tijelo dođe u stanje deformacije, mijenjaju se međusobne udaljenosti između susjednih točaka u tijelu $dl = |d\mathbf{x}|$. Kako vrijedi $d\mathbf{x}' = d\mathbf{x} + d\mathbf{u}$, tu promjenu možemo razviti do drugog reda,

$$dl'^2 = dl^2 + 2u_{ik}dx_i dx_k. \tag{1.2.2}$$

U gornjoj jednadžbi je primijenjena Einsteinova konvencija, gdje ponovljeni indeks predstavlja sumaciju, te će se odsada na dalje uvijek primjenjivati, osim ako nije drugačije naznačeno. Indeksi i, j, k označavaju Kartezijeve koordinate. U jednadžbi (1.2.2) smo uveli tenzor deformacije u_{ik} definiran kao

$$u_{ik} = \frac{1}{2}(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} + \frac{\partial u_l}{\partial x_i}\frac{\partial u_l}{\partial x_k}). \tag{1.2.3}$$

Po svojoj definiciji, tenzor deformacije je simetričan. Ako promatramo izotropno tijelo, možemo pretpostaviti da, pri elastičnoj deformaciji, u volumenu tijela imamo malene vektore pomaka $\mathbf{u}$ onda kada su promjene u relativnim razmacima među točkama tijela male. Tada možemo zanemariti zadnji član član u gornjoj jednadžbi. Tenzor deformacije $\mathbf{u} = [u_{ik}]$ koji možemo koristiti za lokalne volumene je dan s

$$u_{ik} = \frac{1}{2}(\frac{\partial u_i}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i}). \tag{1.2.4}$$

Primjer gdje ne možemo zanemariti drugi član u općenitom izrazu za tenzor deformacije je svijanje tankog štapa, gdje vektori pomaka $\mathbf{u}$ infinitezimalnog volumena dV mogu biti makroskopski, iako se relativni razmaci među točkama tijela nisu puno promijenili. U takvom primjeru moramo koristiti puni izraz za tenzor deformacije (1.2.3).

Tenzor naprezanja i mehanička ravnoteža. Promotrimo gustoću sile $\mathbf{f}$ koja djeluje na neki infinitezimalni volumen dV unutar tijela koje promatramo. Tada se ukupna sila na proizvoljni volumen V unutar tijela može zapisati kao $\mathbf{F} = \int_V \mathbf{f} dV$. Sile kojima različiti

dijelovi tog volumena djeluju jedan na drugi se moraju poništiti zbog Newtonovog trećeg zakona. Stoga se ukupna sila koja djeluje na volumen V može zapisati kao integral tenzora drugog reda, $\boldsymbol{\sigma} = [\sigma_{ij}]$, po površini koja omeđuje taj volumen, $A(V)$, tj. vrijedi $\int_V \mathbf{f} dV = \int_{A(V)} \boldsymbol{\sigma} d\mathbf{A}$, [23]. Iz vektorske analize znamo da je veza tenzora $\boldsymbol{\sigma}$ i gustoće sile $\mathbf{f}$ dana s

$$f_i = \frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k}. \tag{1.2.5}$$

Tenzor $\boldsymbol{\sigma}$ ćemo nazvati tenzor naprezanja. Za tijelo u mehaničkoj ravnoteži, ukupna sila koja djeluje na svaki mogući volumen unutar tog tijela iščezava, tj. vrijedi

$$\mathbf{f} = 0 \Rightarrow \frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} = 0. \tag{1.2.6}$$

Ako je tijelo izloženo polju vanjske sile, tada moramo gornjoj jednadžbi pridodati i utjecaj tog polja na proizvoljni volumen, no tim slučajem se nećemo ovdje baviti. Utjecaj sila kratkog dosega na tijelo u jednadžbu ravnoteže ulazi preko rubnih uvjeta. Jednako kao za sile, zahtijevamo ravnotežu momenata sila među dijelovima proizvoljnog volumena V. Stoga je moguće i ukupni moment sile zapisati kao integral tenzora $\mathbf{G}$ po površini $A(V)$, $\mathbf{M} = \int_V \mathbf{x} \times \mathbf{f} dV = \int_{A(V)} \mathbf{G} d\mathbf{A}$. Ako raspišemo podintegralnu funkciju u volumnom integralu po komponentama, te upotrijebimo vezu između gustoće sile i tenzora naprezanja, tada dobivamo

$$\mathbf{x} \times \mathbf{f} = \frac{\partial \sigma_{il}}{\partial x_l} x_k - \frac{\partial \sigma_{kl}}{\partial x_l} x_i = \frac{\partial (\sigma_{il} x_k - \sigma_{kl} x_i)}{\partial x_l} - \sigma_{il} \frac{\partial x_k}{\partial x_l} + \sigma_{kl} \frac{\partial x_i}{\partial x_l}. \tag{1.2.7}$$

S obzirom da su Kartezijeve koordinate nezavisne, vrijedi $\frac{\partial x_k}{\partial x_l} = \delta_{kl}$. Očito je da je prvi član gornjeg izraza divergencija tenzora te može biti izražen kao integral po površini. Drugi član općenito također može biti izražen kao divergencija tenzora

$$\sigma_{ik} - \sigma_{ki} = 2 \frac{\partial \psi_{ikl}}{\partial x_l}, \ \psi_{ikl} = -\psi_{kil}, \tag{1.2.8}$$

no mi ćemo pokazati da tenzor naprezanja $\boldsymbol{\sigma}$ može biti transformiran na način da se dokine taj član, s obzirom da jednadžba (1.2.5) ne određuje jedinstveni tenzor $\boldsymbol{\sigma}$. Točnije, možemo definirati novi tenzor $\widetilde{\boldsymbol{\sigma}}$ za kojeg vrijedi

$$\widetilde{\sigma}_{ik} - \sigma_{ik} = \frac{\partial \chi_{ikl}}{\partial x_l},\ \chi_{ikl} = -\chi_{ilk}. \tag{1.2.9}$$

Zbog svojstva antisimetrije tenzora $\boldsymbol{\chi} = [\chi_{ikl}]$ u odnosu na zadnja dva indeksa, očito je da vrijedi $\frac{\partial_{kl}\chi_{ikl}}{\partial x_l \partial x_k} = 0$, te iz toga dobivamo da su tenzori $\widetilde{\boldsymbol{\sigma}}$ i $\boldsymbol{\sigma}$ fizikalno ekvivalentni, tj. $\partial\sigma_{ik}/\partial x_k = \partial\widetilde{\sigma}_{ik}/\partial x_k = F_i$. Sada možemo definirati simetrični tenzor $\widetilde{\boldsymbol{\sigma}}$,

$$\widetilde{\sigma}_{ik} = \frac{1}{2}(\sigma_{ik} + \sigma_{ki}) + \frac{\partial(\psi_{ilk} + \psi_{kli})}{\partial x_l}, \tag{1.2.10}$$

za koji vrijedi transformacija (1.2.9), gdje je

$$\chi_{ikl} = \psi_{kli} + \psi_{ilk} - \psi_{ikl}. \tag{1.2.11}$$

Ovako definirani tenzor χ_{ikl} ima svojstvo simetrije kao tenzor definiran u (1.2.9), te stoga za tenzor $\widetilde{\boldsymbol{\sigma}}$ vrijedi svojstvo simetrije, $\widetilde{\sigma}_{ik} = \widetilde{\sigma}_{ki}$, [24]. Također je potrebno da iščezavaju i momenti sila koji djeluju na proizvoljni volumen V unutar tijela,

$$\mathbf{x} \times \mathbf{f} = 0 \Rightarrow \frac{\partial \sigma_{il}}{\partial x_l} x_k - \frac{\partial \sigma_{kl}}{\partial x_l} x_i = 0. \tag{1.2.12}$$

Slobodna energija izotropnih tijela. Cilj nam je izvesti slobodnu energiju po jedinici volumena za čvrsto, izotropno tijelo koje je izloženo elastičnoj deformaciji, kako bismo pronašli vezu tenzora naprezanja i tenzora deformacije, te konačno jednadžbu mehaničke ravnoteže. Za slobodnu energiju po jedinici volumena H vrijedi definicija

$$\sigma_{ik} = \partial H/\partial u_{ik}. \tag{1.2.13}$$

Ako pretpostavimo da su deformacije tijela malene, možemo razviti slobodnu energiju H u red po deformaciji u_{ik}. Ako promatramo izotropno tijelo koje je u stanju elastične deformacije, očekujemo da će se ono vratiti u nedeformirano stanje kada prestanu na njega djelovati vanjske sile. To znači da ako vrijedi $\sigma_{ik} = 0$, vrijedi i $u_{ik} = 0$. Stoga nema linearnog člana u razvoju H po u_{ik}. Također moramo uzeti u obzir da je H skalarna veličina koja je invarijantna na rotacije. Postoje dva linearno nezavisna i rotaciono invarijantna skalara, drugog

reda s obzirom na tenzor deformacije $\mathbf{u}$, a to su kvadrat sume dijagonalnih članova $(u_{ii})^2$ i suma kvadrata svih članova $u_{ik}u_{ik}$, te stoga slobodnu energiju po jedinici volumena možemo zapisati u razvoju do drugog reda,

$$H = H_0 + \frac{1}{2}\lambda(u_{ii})^2 + \mu u_{ik}u_{ik}. \tag{1.2.14}$$

Koeficijente λ i μ nazivamo Laméovi koeficijenti. Ako regrupiramo članove gornjeg izraza za slobodnu energiju,

$$H = \mu(u_{ik} - \frac{1}{3}\delta_{ik}u_{ll})^2 + \frac{1}{2}Ku_{ll}^2, \tag{1.2.15}$$

možemo definirati koeficijent smicanja, μ, koji stoji uz dio deformacije koji opisuje promjene oblika bez promjene volumena, te koeficijent hidrostatske kompresije, K, koji opisuje promjenu volumena bez promjene oblika. Veza koefcijenta K s Laméovim koeficijentima je dana s

$$K = \lambda + \frac{2}{3}\mu. \tag{1.2.16}$$

Sada možemo iz definicije slobodne energije po jedinici volumena (1.2.13) dobiti vezu između tenzora naprezanja i tenzora deformacije,

$$\sigma_{ik} = Ku_{ll}\delta_{ik} + 2\mu(u_{ik} - \frac{1}{3}\delta_{ik}u_{ll}). \tag{1.2.17}$$

Ravnoteža sila na vanjskoj površini tijela. Ako na tijelo djeluju vanjske sile i momenti sila kratkog dosega, kao što je slučaj za sustav koji u ovom radu opisujemo, one će se pojaviti u rubnim uvjetima za jednadžbe ravnoteže sila i momenata sila za to tijelo. Ako je $\mathbf{P}$ tlak koji djeluje na vanjsku površinu tijela, vanjska sila na infinitezimalni element dA te površine je $\mathbf{P}dA$. U mehaničkoj ravnoteži, vanjski tlak mora biti uravnotežen unutarnjom silom reakcije tijela koja djeluje na taj isti infinitezimalni element, i koja je jednaka $\sigma_{ik}dA_k$. dA_k je komponenta k vektora normale infinitezimalne površine $n_k dA$. Rubni uvjet za ravnotežu sila sada glasi

$$\boldsymbol{\sigma}\mathbf{n} = \mathbf{P}. \tag{1.2.18}$$

Youngov modul i Poissonov omjer. Ovdje ćemo promotriti homogene deformacije izotropnih tijela, kod kojih su naprezanje i deformacija jednaki u cijelom volumenu tijela. Pretpostaviti ćemo da uniformni tlak $\mathbf{P}$ djeluje na dvije suprotne, međusobno paralelne, površine tijela, te se uslijed toga tijelo može rastezati ili skupljati. Za smjer z osi izabiremo os simetrije tijela koja prolazi kroz te dvije površine. Pretpostavljamo da nema vanjskih sila na bočnim stranama tijela, stoga uvjet za ravnotežu sila na površini tijela (1.2.18) daje $\sigma_{ik}n_k = 0$ za $k = x, y$. Taj uvjet i simetrija tenzora naprezanja daje iščezavanje svih njegovih komponenti osim σ_{zz}. Rubni uvjet za ravnotežu sila na površini gdje djeluje $\mathbf{P}$ određuje jedinu komponentu tenzora naprezanja $\sigma_{zz} = |\mathbf{P}|$. Iz jednadžbe koja povezuje naprezanje i deformaciju proizlazi da će preostati samo dijagonalne komponente tenzora deformacije,

$$u_{xx} = u_{yy} = -\nu u_{zz},\ u_{zz} = |\mathbf{P}|/E. \tag{1.2.19}$$

Koeficijenti E i ν se nazivaju Youngov modul i Poissonov omjer. Youngov modul je mjera longitudinalnog istezanja tijela, a Poissonov omjer mjera transverzalne kompresije tijela uslijed rastezanja. Te dvije veličine su eksperimentalno dostupne za mnoge materijale i stoga se češće pojavljuju u literaturi nego koeficijenti hidrostatske kompresije i smicanja. Veza novih i starih koeficijenata je dana s

$$E = 9K\mu/(3K + \mu),\ \nu = \frac{1}{2}(3K - 2\mu)/(3K + \mu). \tag{1.2.20}$$

Poissonov omjer može poprimiti vrijednosti između -1 i $1/2$ uključivo. Veza tenzora naprezanja i deformacije za izotropna tijela zapisana pomoću novih koeficijenata sada glasi:

$$\sigma_{ik} = \frac{E}{1+\nu}(u_{ik} + \frac{\sigma}{1-2\nu}u_{ll}\delta_{ik}). \tag{1.2.21}$$

Mehanička ravnoteža izotropnih tijela. Razmotriti ćemo općenitu jednadžbu mehaničke ravnoteže za tijelo koje nije izloženo polju sile dugog dosega, danu s (1.2.6). U tu jednadžbu uvrstit ćemo izraz (1.2.21) koji povezuje naprezanje s deformacijom za izotropna tijela, kao i definiciju tenzora deformacije (1.2.4). Jednadžba ravnoteže je tada dana s

$$(1-2\sigma)\triangle\mathbf{u}+\nabla(\nabla\cdot\boldsymbol{u})=0. \tag{1.2.22}$$

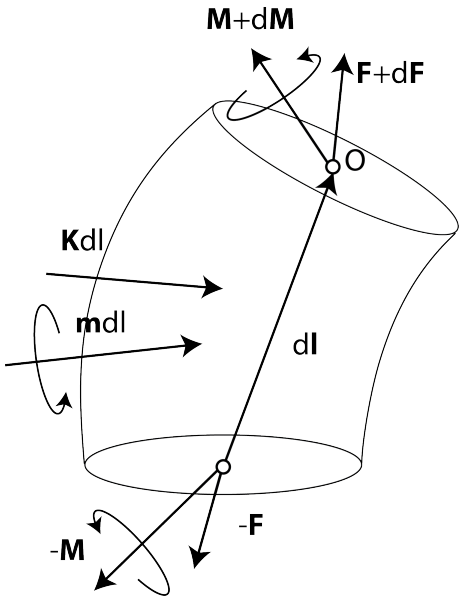
1.2.2 Primjena teorije elastičnosti na tanke štapove

Jednadžba ravnoteže za tanki štap. Da bismo pronašli jednadžbu ravnoteže za tanki štap, razmotrit ćemo infinitezimalni dio tankog štapa, ograničenog s dvije međusobno suprotne infinitezimalne površine, koje su okomite na njegovu glavnu os, kao što je prikazano na slici 13. Površine ćemo nazvati gornja i donja. Vektor položaja donje površine ćemo nazvati $\mathbf{l}$, dok je vektor položaja gornje površine dan s $\mathbf{l}+d\mathbf{l}$. Vektor tangente na konturu tankog štapa je tada dan s $\mathbf{t}=d\mathbf{l}/dl$. Pretpostavit ćemo da na gornjoj površini infinitezimalnog elementa djeluje unutarnja sila $\mathbf{F}+d\mathbf{F}$, dok na donjoj djeluje unutarnja sila $-\mathbf{F}$. Zbroj sila na rubovima elementa je dan s $d\mathbf{F}$. Uzeti ćemo u obzir da na element djeluje i vanjska sila po jedinici duljine $\mathbf{f}$. Ukupna vanjska sila na element je tada $\mathbf{f}\,dl$. Zbroj svih vanjskih i unutarnjih sila je tada $d\mathbf{F}+\mathbf{f}\,dl$. Ako je štap u mehaničkoj ravnoteži, nužno mora vrijediti

$$\frac{d\mathbf{F}}{dl}=-\mathbf{f}. \tag{1.2.23}$$

Osim iščezavanja ukupne sile na svaki infinitezimalni element tankog štapa, u mehaničkoj ravnoteži mora vrijediti i iščezavanje ukupnog momenta sile. Ukupni moment sile na element ćemo promatrati u odnosu na točku O koja leži na gornjoj površini elementa. Neka je $-\mathbf{M}$ unutarnji moment sile koji djeluje na donjoj površini elementa, te $\mathbf{M}+d\mathbf{M}$ unutarnji moment sile koji djeluje na gornjoj površini elementa. Također, oko točke O djeluje i moment unutarnje sile $-d\mathbf{l}\times-\mathbf{F}$. Ukupni unutarnji moment oko točke O je tada $d\mathbf{M}+d\mathbf{l}\times\mathbf{F}$. Na element mogu djelovati i vanjski momenti sila po jedinici duljine $\mathbf{m}$. Za tanki štap u mehaničkoj ravnoteži uz (1.2.23) mora vrijediti i ravnoteža momenata sila,

$$d\mathbf{M}+d\mathbf{l}\times\mathbf{F}=-\mathbf{m}dl. \tag{1.2.24}$$



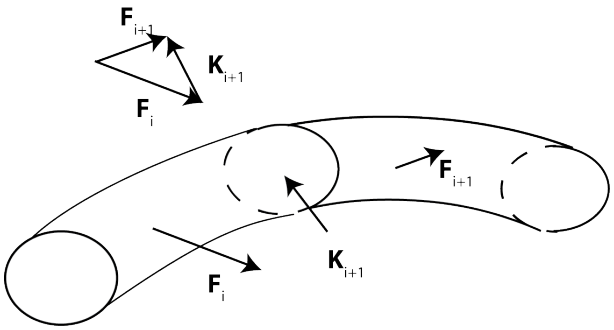
Slika 13: Geometrija infinitezimalnog elementa tankog štapa, te sile i momenti koje djeluju na taj element.

Ako iskoristimo činjenicu da je $d\mathbf{l}/dl = \mathbf{t}$, tada vrijedi

$$d\mathbf{M}/dl = -\mathbf{t} \times \mathbf{F} - \mathbf{m}. \tag{1.2.25}$$

Jednadžbe (1.2.23) i (1.2.25) sada opisuju mehaničku ravnotežu tankog savitljivog štapa pod djelovanjem općenitih sila i momenata sila. Ovdje ćemo još raspraviti specijalni slučaj gdje vanjska sila djeluje u izoliranim točkama duž konture štapa. Tada možemo štap podijeliti na segmente označene indeksom i , koji se pružaju između točaka u kojima djeluju vanjske sile $\mathbf{K}_i$, kao na slici 14. Jednadžbe (1.2.23) i (1.2.24) sada rješavamo po segmentima, te vrijedi $\mathbf{f} = 0$ i $\mathbf{F}_i = const.$ Također vrijede rubni uvjeti u točkama gdje djeluju vanjske sile $\mathbf{K}_i$,

$$\mathbf{F}_{i+1} - \mathbf{F}_i = -\mathbf{K}_{i+1}. \tag{1.2.26}$$



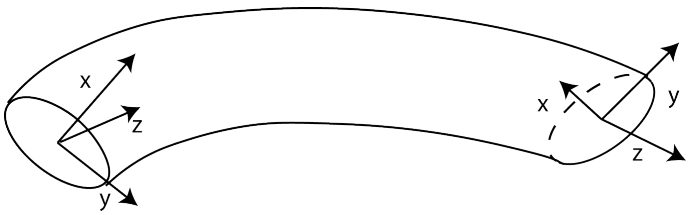
Slika 14: Podjela konture tankog štapa na segmente, odijeljene točkama u kojima lokalno djeluju vanjske sile.

Analogno, raspravit ćemo i slučaj gdje na infinitezimalni element djeluju vanjski momenti sila u izoliranim točkama. Tada možemo štap podijeliti na segmente označene indeksom i, koji se pružaju između točaka, gdje djeluju vanjski momenti $\mathbf{O}_i$. Unutarnji moment sila u segmentima, $\mathbf{M}_i$, se dobiva iz jednadžbi (1.2.23) i (1.2.24), uz uvjet $\mathbf{m} = 0$, te rubni uvjet u točkama djelovanja vanjskih momenata $\mathbf{O}_i$,

$$\mathbf{M}_{i+1} - \mathbf{M}_i = -\mathbf{O}_{i+1}. \tag{1.2.27}$$

Ovako definiran problem u potpunosti određuje oblik štapa ako su zadani sile i momenti koji na njega djeluju. Valja naglasiti da je moguće jednoznačno odrediti momente i sile iz poznavanja oblika, što je pristup koji nas je doveo do glavnih rezultata u ovom radu.

Svijanje i torzija (uvijanje) tankog savitljivog štapa. Reakcija tankog savitljivog štapa na vanjsko opterećenje se može podijeliti na svijanje i torziju (uvijanje). Da bismo bolje razumjeli obje vrste deformacije tankih štapova, uz geometriju definiranu u prethodnom paragrafu, uvest ćemo lokalni koordinatni sustav, čija je jedna os paralelna s tangentom na konturu tankog štapa $\mathbf{t}$, dok su druge dvije osi paralelne dvama glavnim osima inercije poprečnog presjeka, kao što je prikazano na slici 15.



Slika 15: Lokalni koordinatni sustavi u dvije točke duž konture tankog štapa.

Na taj način možemo definirati vektor $\boldsymbol{\phi}$ kao vektor rotacije lokalnog koordinatnog sustava u točki zadanoj položajem $\mathbf{l}$ na konturi u odnosu na isti takav sustav u fiksnoj točki duž konture. Komponente vektora $\boldsymbol{\phi}$ su relativne rotacije oko svake od tri osi koordinatnog sustava. Vektor $d\boldsymbol{\phi}$ je tada vektor relativne rotacije dvaju lokalnih koordinatnih sustava udaljenih za udaljenost dl. Definirat ćemo vektor deformacije tankog štapa $\boldsymbol{\Omega}$,

$$\boldsymbol{\Omega} = \frac{d\boldsymbol{\phi}}{dl}. \tag{1.2.28}$$

Komponenta vektora $\boldsymbol{\Omega}$ koja je paralelna sa konturom tankog štapa u toj točki nazivamo deformacijom torzije (uvijanja), dok komponentu okomitu na konturu štapa nazivamo deformacijom svijanja. Promjena tangente na konturu štapa zbog rotacije lokalnih koordinatnih sustava je dana s

$$d\mathbf{t}/dl = \boldsymbol{\Omega} \times \mathbf{t}. \tag{1.2.29}$$

Ako tu jednadžbu vektorski pomnožimo s $\mathbf{t}$, dobivamo:

$$\boldsymbol{\Omega} = \mathbf{t} \times d\mathbf{t}/dl + \mathbf{t}(\mathbf{t} \cdot \boldsymbol{\Omega}). \tag{1.2.30}$$

Vektor normale na konturu tankog štapa je definiran kao $\boldsymbol{n} = Rd\mathbf{t}/dl$, gdje je R radijus zakrivljenosti, a vektor binormale kao $\mathbf{b} = \mathbf{t} \times \mathbf{n}$, te su deformacije torzije i svijanja dane s

$$\Omega_{tw} = \mathbf{t} \cdot \boldsymbol{\Omega} = \frac{d\phi_z}{dl},\ \Omega_b = \mathbf{b} \cdot \boldsymbol{\Omega} = 1/R. \tag{1.2.31}$$

Slobodna energija elastičnog tankog štapa. Kako znamo da je slobodna energija po jedinici duljine tankog elastičnog štapa kvadratna forma deformacije, možemo je zapisati kao

$$\mathcal{H} = c_{tw,tw}\Omega_{tw}\Omega_{tw} + c_{b,b}\Omega_b\Omega_b + c_{tw,b}\Omega_{tw}\Omega_b. \tag{1.2.32}$$

Pretpostavljamo da je tanki štap uniformnih svojstava duž svoje duljine, te je u tom slučaju slobodna energija invarijantna na transformaciju $\mathbf{t} \to -\mathbf{t}$. Takva transformacija je ekvivalentna zamjeni $c_{tw,b} \to -c_{tw,b}$, iz čega slijedi $c_{tw,b} = 0$. Stoga je izraz za slobodnu energiju po jedinici duljine dan s

$$\mathcal{H} = \frac{\kappa}{2}\Omega_{tw}^2 + \frac{\tau}{2}\Omega_b^2. \tag{1.2.33}$$

Koeficijent κ nazivamo modul elasticiteta, dok koeficijent τ nazivamo modul torzije, te vrijedi $\kappa = 2c_{tw}$ i $\tau = 2c_b$ Definicija slobodne energije po jedinici duljine za tanki štap je zadana s relacijom

$$M_i = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \Omega_i}. \tag{1.2.34}$$

Iz te definicije dobivamo da su komponente momenata sila su povezane s komponentama vektora deformacije tankog štapa preko modula svijanja i torzije, κ i τ,

$$\mathbf{M} = \kappa\Omega_b\mathbf{t} \times \mathbf{dt} + \tau\Omega_{tw}\mathbf{t}. \tag{1.2.35}$$

Gornju jednadžbu još nazivamo i konstitutivna jednadžba. Ako promotrimo veličinu $\mathbf{M} \cdot \mathbf{t}$, njezina promjena po konturi elastičnog štapa je:

$$\frac{d}{dl}(\mathbf{M} \cdot \mathbf{t}) = \frac{d\mathbf{M}}{dl} \cdot \mathbf{t} + \mathbf{M} \cdot \frac{d\mathbf{t}}{dl}. \tag{1.2.36}$$

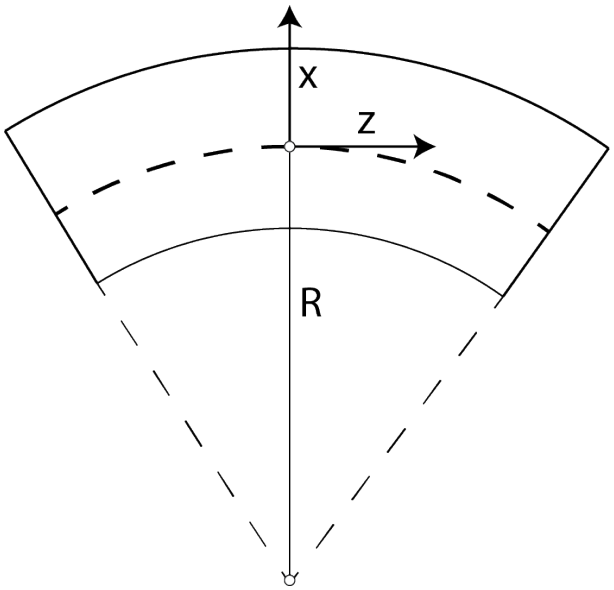
Iz (1.2.25) vidimo da, u odsutnosti gustoće vanjskog momenta sile, prvi član s desne strane iščezava, dok zbog (1.2.35) drugi član s desne strane iščezava. Stoga vrijedi:

$$\frac{d\Omega_{tw}}{dl} = 0 \Rightarrow \Omega_{tw} = const. \tag{1.2.37}$$

Drugim riječima, torzija tankog elastičnog štapa se ne mijenja između točaka u kojima djeluju lokalizirani vanjski momenti sila.

Moduli svijanja i torzije. U ovom odjeljku ćemo prvo izvesti izraz za modul svijanja tankog štapa, κ, preko Yougovog modula, te potom izvesti njegovu vezu s modulom torzije, τ. Zbog jednostavnosti ćemo promatrati samo svijanje u smjeru osi y. Za svinuti štap možemo definirati površinu na kojoj vrijedi da je $u_{ii} = 0$, gdje se ta površina proteže duž cijelog štapa, koju ćemo nazvati neutralna površina. Pretpostavit ćemo da se štap pruža duž osi z, dok se svijanje događa u ravnini zx. Može se pokazati da neutralna površina prolazi kroz centre masa poprečnih presjeka štapa, [22]. Pretpostavit ćemo da su vanjska naprezanja na vanjskoj površini infinitezimalnog elementa mala u odnosu na unutarnja naprezanja. Primijetimo da vektor elementa vanjske površine $\mathbf{n}$ nema komponentu n_z , s obzirom da je element vanjske površine približno paralelan sa smjerom pružanja štapa z. Ravnoteža sila na vanjskoj površini je zadana jednadžbom (1.2.18), te se može raspisati po komponentama kao $\sigma_{ix}n_x + \sigma_{iy}n_y = 0,\ i = x, y, z$. Primijetimo da se na vanjskom obodu poprečnog presjeka može pronaći element površine čiji vektor ima samo komponentu n_x , te njemu ekvivalentni element koji ima istu takvu komponentu, ali suprotnog smjera. Za oba ta elementa vrijedi $n_y = 0$ i $\sigma_{xx} = 0$. Analogno vrijedi i za komponentu σ_{yy}. Ako pretpostavimo da je štap tanak, te da komponente σ_{xx} i σ_{yy} iščezavaju u dvije točke na površini oboda poprečnog presjeka, tada to mora vrijediti i u cijelom poprečnom presjeku infinitezimalnog elementa. Iz tog uvjeta izlazi da su sve komponente tenzora naprezanja osim σ_{zz} jednake nuli u infinitezimalnom elementu štapa, a time i u samom štapu. Jedina preostala komponenta σ_{zz} predstavlja ekstenziju ili kompresiju štapa. Sada možemo odrediti geometrijski ekstenziju $dz' - dz$, relativno prema neutralnoj površini. Pretpostaviti ćemo da je $R(z)$ lokalni radijus zakrivljenosti neutralne površine. Možemo vidjeti, iz sličnosti trokuta na slici 13, da za dva paralelna odsječka $dz,\ dz'$ duž osi z , od kojih je dz na neutralnoj površini vrijedi

$$dz' = \left(\frac{R + x}{R}\right) dz. \tag{1.2.38}$$



Slika 16: Geometrija infinitezimalnog elementa tankog štapa koji trpi svijanje.

Iz definicije tenzora deformacije, dane sa (1.2.2), dobivamo da je relativna ekstenzija $u_{zz} = x/R(z)$ i, koristeći jednadžbu (1.2.19), dobivamo da je jedina ne-iščezavajuća komponenta tenzora naprezanja dana s $\sigma_{zz} = Ex/R(z)$. Znamo da, ako postoji komponenta tenzora deformacije u_{zz}, nužno postoje i komponente $u_{xx}, u_{yy} = -\sigma u_{zz}$, što se također dobiva iz jednadžbe (1.2.19). Uvrštavajući izraze za tenzore deformacije i naprezanja u slobodnu energiju po jedinici volumena (1.2.14) dobivamo

$$H = \frac{1}{2}\sigma_{zz}u_{zz} = \frac{1}{2}Ex^2/R(x,y,z)^2. \tag{1.2.39}$$

Iz izraza za slobodnu energiju po jedinici duljine zadanog s (1.2.33), za čisto svijanje dobivamo

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2}\kappa\frac{1}{R(z)^2}. \tag{1.2.40}$$

Stoga možemo dobiti izraz za lokalni modul svijanja,

$$\kappa = E\iint\limits_{x,y} x^2 dxdy, \tag{1.2.41}$$

gdje pretpostavljamo da je štap tanak, te je $R(x,y,z)$ približno konstantan unutar poprečnog

presjeka. Ovdje integralni izraz predstavlja moment tromosti poprečnog presjeka tankog štapa oko osi svijanja y. Identičan izvod vrijedi i za svijanje oko osi x. Može se izvesti da u posebnom slučaju kružnog poprečnog presjeka vrijedi

$$\kappa = \frac{1}{4} E \pi R^4. \tag{1.2.42}$$

Zanima nas također i veza između koeficijenata torzije i koeficijenata svijanja. Pretpostavit ćemo da vektor torzije gleda u smjeru osi z, te ima iznos koji je jednak relativnoj promjeni kuta ϕ_z između dva uzastopna poprečna presjeka. Tada su pomaci u smjeru osi x i y za tanki štap koji trpi čistu torziju dani s

$$u_x = -\frac{d\phi_z}{dz} zy, \; u_y = \frac{d\phi_z}{dz} zx. \tag{1.2.43}$$

Takav štap će generalno imati i pomak u smjeru osi torzije, koji možemo zapisati kao

$$u_z = \frac{d\phi_z}{dz} \psi(x, y), \tag{1.2.44}$$

gdje je $\psi(x, y)$ torzijska funkcija koja opisuje deformaciju poprečnog presjeka. Primijetimo da je vektor torzije jednak komponenti Ω_z vektora deformacije tankog štapa, $\mathbf{\Omega}$, definiranog u prethodnom paragrafu.

Sada kada znamo sve komponente vektora deformacije možemo napisati tenzor deformacije u_{ij} i tenzor naprezanja σ_{ij}. S obzirom da možemo pretpostaviti da je pomak $\mathbf{u}$ u infinitezimalnom elementu štapa mali, možemo izračunati tenzor deformacije pomoću izraza (1.2.4), te iz poznavanja vektora pomaka $\mathbf{u}$ zadanog komponentama (1.2.43) i (1.2.44). Jedine komponente tenzora deformacije koje ne iščezavaju su u_{xz} i u_{yz}. Znamo da za čistu torziju vrijedi $u_{ii} = 0$, jer torzija ne proizvodi promjenu lokalnog volumena tankog štapa. Iz jednadžbe (1.2.14) dobivamo da su jedine dvije komponente tenzora naprezanja koje ne iščezavaju $\sigma_{xz} = 2\mu u_{xz}$ i $\sigma_{yz} = 2\mu u_{yz}$. Te komponente su dane s

$$u_{xy} = \frac{1}{2} \frac{d\phi_z}{dz} \left(\frac{\partial \psi}{\partial x} - y \right), \; u_{yz} = \frac{1}{2} \frac{d\phi_z}{dz} \left(\frac{\partial \psi}{\partial y} + x \right). \tag{1.2.45}$$

Sada možemo napisati izraz za slobodnu energiju po jedinici volumena $H = \frac{1}{2} \mu u_{ij} u_{ij} =$

$\frac{1}{2}\mu(u_{xz}^2 + u_{yz}^2)$ koji sadržava torzijsku funkciju $\psi(x, y)$, a samim time i izraz za slobodnu energiju po jedinici duljine,

$$\mathcal{H} = \frac{1}{4}\mu \iint\limits_{x,y} \left(\frac{d\phi_z}{dz}\right)^2 \left(\left(\frac{\partial\psi}{\partial x} - y\right)^2 + \left(\frac{\partial\psi}{\partial y} + x\right)^2\right) dxdy. \tag{1.2.46}$$

S druge strane, znamo da je izraz za slobodnu energiju po jedinici duljine, dan s (1.2.33), za čistu torziju dan s

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2}\tau \left(\frac{d\phi_z}{dz}\right)^2. \tag{1.2.47}$$

Iz toga možemo zaključiti da je modul torzije jednak

$$\tau = \frac{1}{4}\mu \iint\limits_{x,y} \left(\left(\frac{\partial\psi}{\partial x} - y\right)^2 + \left(\frac{\partial\psi}{\partial y} + x\right)^2\right) dxdy. \tag{1.2.48}$$

Ovdje smo pretpostavili da se kut torzije ϕ_z ne mijenja značajno unutar poprečnog presjeka tankog štapa. Ako pretpostavimo da je poprečni presjek štapa savršena kružnica radijusa R, možemo dobiti izraz da je modul torzije jednak $\tau = \frac{1}{2}\mu\pi R^4$, što je detaljnije izvedeno u [22].

2 Premosni mikrotubuli i ravnoteža sila u metafazi

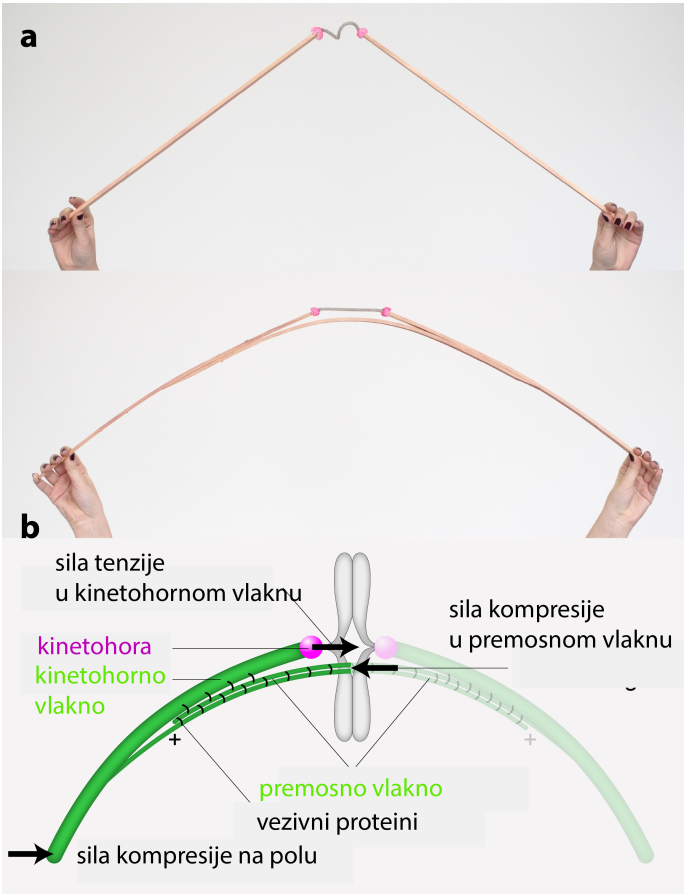
2.1 Postojanje i svojstva premosnih mikrotubula

2.1.1 Premosno vlakno povezuje par kinetohornih vlakana

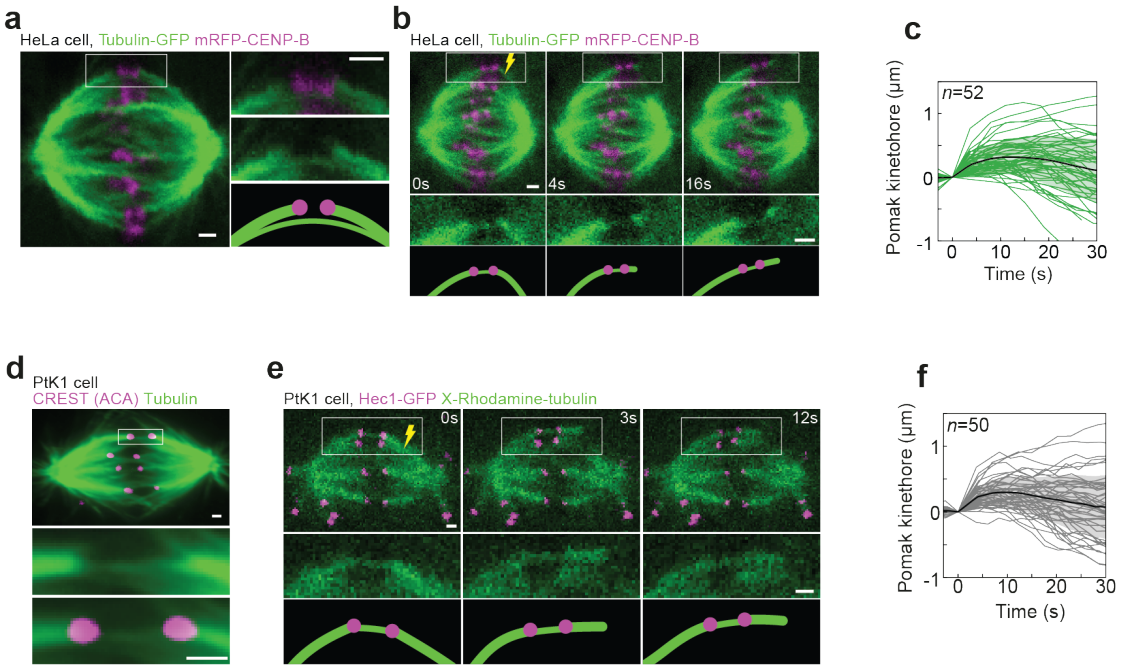
U ovom radu želimo uvođenjem nove klase mikrotubula objasniti paradoks ravnoteže sila koji smo opisali u prethodnom poglavlju. Dosadašnji eksperimenti su pokazali postojanje mikrotubula između kinetohora, [45], [67], [68]. Motivirani tim saznanjem, odlučili smo provjeriti čine li ti mikrotubuli, koje smo nazvali premosnim mikrotubulima, jedinstveni mehanički objekt zajedno sa kinetohornim vlaknima. U našim eksperimentima smo pokazali da su premosni mikrotubuli organizirani u premosno vlakno, i to u grupi od $10 - 15$ mikrotubula. Takav mehanički objekt bi mogao na uravnotežiti tenziju na kinetohorama, kako je pokazano na jednostavnom mehaničkom modelu, slika 17, panel a), te bi također objasnio i opaženu zakrivljenost kinetohornih vlakana. Kako bismo potvrdili našu hipotezu o postojanju premosnih mikrotubula, u suradničkom laboratoriju Ive Tolić proveden je niz eksperimenata na živim ljudskim tumorskim stanicama, tzv. HeLa staničnoj liniji, koje su genetski modificirane tako da uz prirodni tubulin proizvode i obilježeni tubulin koji fluorescira u zelenoj boji, kao i obilježeni CENP-B protein koji se prirodno nalazi na kinetohorama, a fluorescira u crvenoj boji. Te stanice su snimljene pod laserskim osvjetljenjem i to u nizu ravnina, pri čemu su ravnine bile međusobno udaljene 0.5 µm. Korištena metoda se naziva fluorescencijska konfokalna mikroskopija [69]. Izabrana je velika gustoća ravnina, s obzirom da je tipična duljina i promjer HeLa stanica oko 10 µm. Snimke pokazuju kako se u području između kinetohora pojavljuje slab signal tubulina, što smo interpretirali kao prisutnost premosnih mikrotubula koji povezuje dva kinetohorna vlakna. Intenzitet signala tubulina između kinetohora pokazuje da u njemu sudjeluje više od jednog premosnog mikrotubula, te možemo zaključiti da su premosni mikrotubuli vezani u premosno vlakno. Postavlja se pitanje je li premosno vlakno zaista vezano sa kinetohornim vlaknima, te čine li ta dva vlakna jedinstveni mehanički objekt, s obzirom da prostorna blizina premosnih mikrotubula i kinetohornih vlakana ne daje informaciju o njihovoj međusobnoj interakciji. Kako bi odgovorili na to pitanje, dizajniran je eksperiment rezanja vanjskog para kinetohornih vlakana bliže jednom od polova na HeLa

stanicama, slika 18. Razlog zašto je za taj eksperiment odabran vanjski par kinetohornih vlakana jest njegova razlučivost u odnosu na susjedna kinetohorna vlakna. U slučaju da su premosno i kinetohorna vlakna povezani, očekujemo da će se oni koordinirano gibati i izravnavati nakon rezanja. Opaženo je da se nakon rezanja kinetohore gibaju od središta diobenog vretena, te pri tome dosežu maksimalni odmak od 320 ± 40 µm, u odnosu na prijašnji položaj, i to su vremenu od 11 s. Nakon toga se kinetohore gibaju natrag prema središtu diobenog vretena, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima, [72], [73]. Ako se gibanje kinetohore bliže rezu promatra u dvije dimenzije, možemo vidjeti da ona slijedi trajektoriju „V" oblika, pri čemu se giba prvo od središta diobenog vretena i prema sestrinskoj kinetohori, te zatim prema središtu diobenog vretena. Glavni rezultat ovog eksperimenta je opažanje premosnog vlakna u spregnutom gibanju s kinetohorama i kinetohornim vlaknima tijekom cijelog odgovora na rezanje, tj. sve do ponovnog vezivanja kinetohornog vlakna u diobeno vreteno. Na temelju tog eksperimenta, zaključujemo da premosno vlakno povezuje sestrinska kinetohorna vlakna i kinetohore u jedinstveni mehanički objekt. Kako bismo vidjeli pojavljuju li se premosni mikrotubuli i u stanicama drugih sisavaca, analizirali smo PtK1 stanice (stanice skočimiša), gdje su također opaženi premosni mikrotubuli između kinetohora. PtK1 stanice su genetski modificirane tako da proizvode obilježeni Hec1 protein na kinetohorama, te je u njih injektiran X-Rhodamine-tubulin koji fluorescira zeleno. Izmjereni intenzitet tubulina između kinetohora je puno slabiji nego kod HeLa stanica, što upućuje na tanje premosno vlakno. Opažen je isti odgovor na rezanje kao i kod HeLa stanica ($n = 30$ stanica), pri čemu se premosno i kinetohorna vlakna sa kinetohorama ponovno gibaju i izravnavaju u sprezi. To opažanje proširuje našu hipotezu o organizaciji diobenog vretena na različite stanice sisavaca.

Na temelju gore navedenih mjerenja, možemo pretpostaviti da se premosni mikrotubuli protežu između kinetohora i spajaju dva kinetohorna vlakna lateralno. Naša pretpostavka o organizaciji diobenog vretena uključuje vezivne proteine između kinetohornog i premosnog vlakna, kako je pokazano na slici 17, panel b).



Slika 17: Hipoteza o položaju i ulozi premosnih mikrotubula. a) Drveni model koji demonstrira kako premosno vlakno na sebe može preuzeti silu tenzije između kinetohora. Preuzeto iz [71]. b) Hipoteza o organizaciji snopova mikrotubula u dibenom vretenu. Premosno vlakno nastaje iz dva interpolarna vlakna, međusobno povezana vezivnim proteinima, te je također vezivnim proteinima povezano sa dva kinetohorna vlakna.



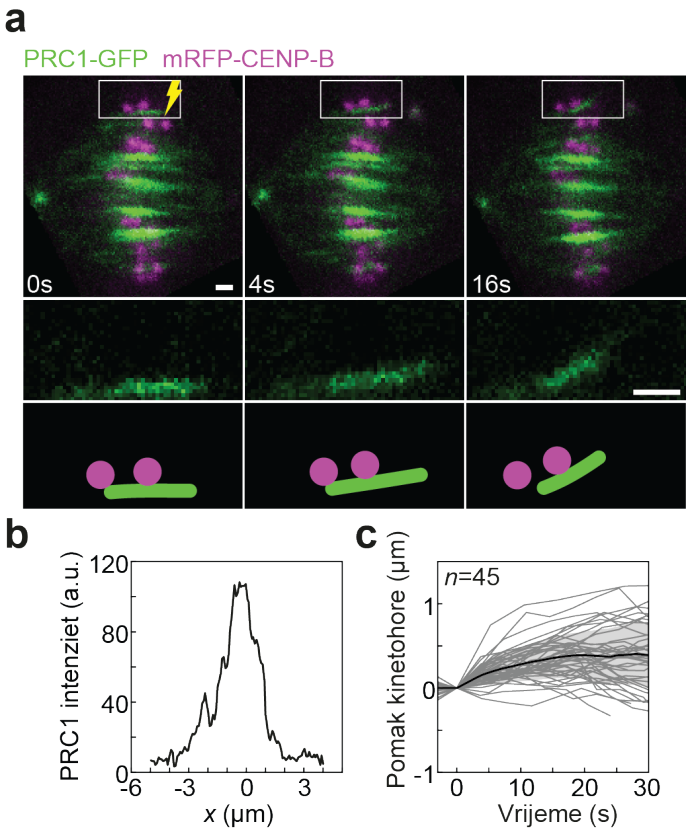
Slika 18: Kinetohorno i premosno vlakno čine jedinstveni mehanički objekt. a) Diobeno vreteno HeLa stanice sa obilježenim tubulinom (zeleno) i kinetohorama (ljubičasto) b) Vremenski isječci gibanja para kinetohornih vlakana i premosnog vlakna nakon laserskog rezanja u HeLa stanici sa obilježenim tubulinom i kinetohorama. c) Pomak kinetohore u HeLa stanicama bliže mjestu rezanja u smjeru okomitom na dulju os vretena, u odnosu na položaj prije rezanja. Pojedine stanice su prikazane kao tanke linije, srednja vrijednost kao debela linija i standardna devijacija kao zasjenjeno područje. d) Diobeno vreteno PtK1 stanice sa obilježenim tubulinom (zeleno) i kinetohorama (ljubičasto). e) Vremenski isječci gibanja para kinetohornih vlakana i premosnog vlakna nakon laserskog rezanja u PtK1 stanici sa obilježenim tubulinom i kinetohorama. f) Pomak kinetohore u PtK1 stanicama bliže mjestu rezanja u smjeru okomitom na dulju os vretena, u odnosu na položaj prije rezanja. Pojedine stanice su prikazane kao tanke linije, srednja vrijednost je prikazana kao debela linija i standardna devijacija kao zasjenjeno područje. Preuzeto iz [66].

2.1.2 Premosno vlakno se sastoji od antiparalelnih dinamičkih mikrotubula

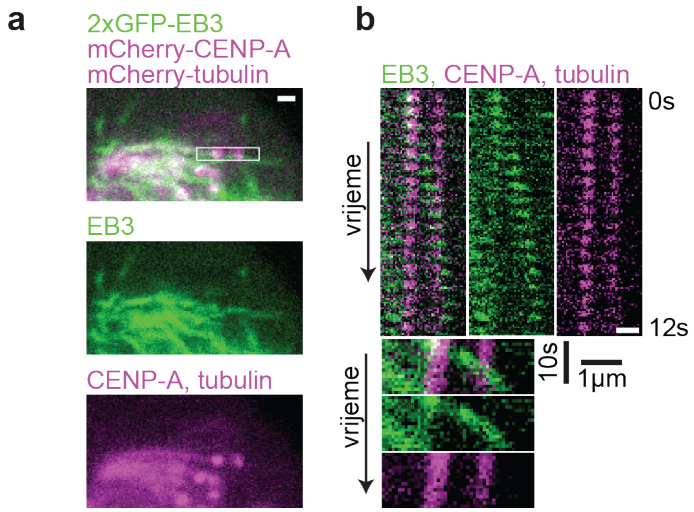
Željeli bismo razumjeti kakva je detaljna organizacija mikrotubula u premosnom vlaknu, tj. jesu li oni paralelni ili antiparalelni, rastu li i skraćuju li se, tj. posjeduju li dinamička svojstva. PRC1 protein je idealan kandidat za testiranje detaljne organizacije mikrotubula, s obzirom da taj protein veže međusobno antiparalelne mikrotubule. Iz tog razloga su HeLa stanice genetski modificirane tako da proizvode obilježeni PRC1 protein. Snimke tih stanica

pokazuju da signal PRC1 proteina ima najveći intenzitet u području oko kinetohora, kao i da se signal pojačava s prelaskom stanice iz metafaze u anafazu, što je u skladu s prethodnim istraživanjima, [74], [75]. Profili intenziteta signala PRC1 proteina pokazuju da se zona antiparalelnih mikrotubula proteže kroz područje od 4.5 ± 0.2 µm u blizini kinetohora. Također je pokazano da se signal PRC1 proteina giba i izravnava koordinirano sa kinetohorama i kinetohornim vlaknima nakon rezanja, što pokazuje da signal PRC1 proteina odgovara srednjem dijelu premosnog vlakna, te potvrđuje antiparalelnu organizaciju premosnog vlakna između kinetohora, slika 19. Ovi eksperimenti su provedeni na $n = 22$ stanice. Još jedan protein koji je dobar kandidat za utvrđivanje detaljne organizacije premosnog vlakna je molekularni motor kinezin-5, u ljudskim stanicama poznat i pod nazivom Eg5, koji je „+" -usmjeren molekularni motor, te povezuje i relativno razmiče antiparalelne mikrotubule. Dizajnirani su eksperimenti sa genetski modificiranim HeLa stanicama koje proizvode obilježeni Eg5 protein, te smo utvrdili slično ponašanje signala tog proteina i njegove dinamike nakon rezanja, kao i kod PRC1 proteina, i to na $n = 30$ stanica.

Dinamika mikrotubula u premosnom vlaknu Također želimo utvrditi jesu li mikrotubuli u premosnom vlaknu dinamički. U tu svrhu su korištene U2OS ljudske stanice koje su genetski modificirane da proizvode obilježeni EB3 protein, koji se prirodno nalazi na „+" krajevima rastućih mikrotubula. U našim eksperimentima, promatrali smo vanjski par kinetohornih vlakana, i to nakon rezanja bliže jednom od polova, kako bi se razlikovao putujući signal EB3 proteina u vanjskom paru kinetohornih vlakana od onog u preostalom dijelu diobenog vretena. Snimci odgovora na rezanje u vremenu omogućuju da se odredi položaj rezanog kinetohornog vlakna, očuvanog kinetohornog vlakna, te premosnog vlakna, pri čemu možemo tu skupinu mikrotubula razlikovati od astralnih mikrotubula. Svaki signal EB3 proteina koji putuje između kinetohora pridružen je premosnom vlaknu, dok je svaki signal EB3 proteina koji završava na kinetohori pridružen kinetohornom vlaknu, slika 20. Izmjerena frekvencija putujućeg signala EB3 proteina je 1.9 ± 0.4 maksimuma signala (kometa) u minuti za premosno vlakno u smjeru prema mjestu reza ($n = 26$ kometa) i 0.6 ± 0.2 kometa u minuti u premosnom vlaknu u smjeru od mjesta reza ($n = 8$ kometa).



Slika 19: Premosni mikrotubuli su antiparalelni. a) Vremenski isječci gibanja para kinetohornih vlakana i premosnog vlakna nakon laserskog rezanja u HeLa stanici sa obilježenim vezivnim proteinom PRC1 i kinetohorama. b) Ovisnost intenziteta signala PRC1 proteina o položaju uzduž konture vanjskog snopa mikrotubula. Sredina između kinetohora je u ishodištu. c) Ovisnost pomaka kinetohore, bliže mjestu laserskog rezanja, u smjeru okomitom na glavnu os diobenog vretena, za HeLa stanice s obilježenim vezivnim proteinom PRC1. Pomak je izračunat u odnosu na njezin položaj prije laserskog rezanja. Preuzeto iz [66].



Slika 20: Premosni mikrotubuli su dinamički. a) Projekcija niza isječaka u vremenu od 7 s U2OS stanice sa obilježenim EB3 proteinom, tubulinom i kinetohorama. U srednjem panelu su prikazani maksimumi signala EB3 proteina (kometi), a u donjem mikrotubuli i kinetohore. Na gornjem panelu je prikazana superpozicija donja dva panela. b) U gornjem panelu je prikazan kimograf signala EB3 proteina (zeleno) između kinetohora (ljubičasto), pri čemu je analizirano područje unutar bijelog pravokutnika iz a). U donjem panelu je prikazana maksimalna projekcija gornjeg kimografa. Preuzeto iz [66].

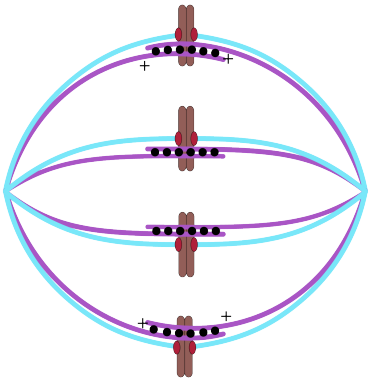
Na taj način je pokazano da premosno vlakno sadrži antiparalelne mikrotubule koji rastu i skraćuju se. Ujedno je pokazano, nezavisno od promatranja intenziteta tubulina, da kinetohorna vlakna i premosno vlakno imaju približno sličan broj mikrotubula, s obzirom da je frekvencija EB3 signala u kinetohornom vlaknu dalje od mjesta reza 2.0 ± 0.4 kometa u minuti a u rezanom kinetohornom vlaknu 0.8 ± 0.2 kometa u minuti. Izmjerene brzine kometa su približno slične u premosnim (13.1 ± 1.1 μmmin^{-1}), kinetohornim (13.3 ± 1.2 μmmin^{-1}) i astralnim (11.9 ± 0.3 μmmin^{-1}) mikrotubulima, što pokazuje na slične mehanizme polimerizacije za sve navedene skupine mikrotubula.

2.2 Teorijski model

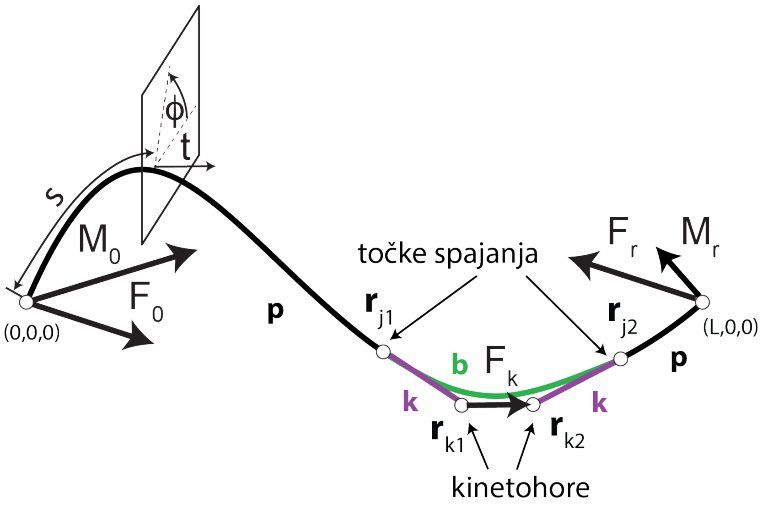
2.2.1 Modeliranje para kinetohornih vlakana spojenih premosnim vlaknom

Motivirani eksperimentalnim pronalaskom premosnih mikrotubula, te njihovom prostornom organizacijom, postavili smo hipotezu o građi diobenog vretena u kojem je svakom paru sestrinskih kinetohornih vlakana pridruženo jedno premosno vlakno, što je prikazano na slici 21. Ta hipoteza je i naknadno potvrđena novim eksperimentalnim mjerenjima diobenih

vretena živih stanica s pojačanom ekspresijom PRC1 proteina, [76]. Razvijen je model koji uključuje sva tri vlakna, u kojem su vlakna opisana kao tanki elastični štapovi, slika 22, kojima se modul svijanja skalira s brojem mikrotubula. Skaliranje modula svijanja je motivirano radom u kojem je utvrđeno fleksibilno, a ne čvrsto vezivanje mikrotubula u snopove, [14], tj. mikrotubuli se pri deformaciji svijanja savijaju nezavisno od svojih susjeda. U suprotnom slučaju, svi mikrotubuli doprinose poprečnom presjeku snopa iz kojeg se izračunava modul elasticiteta, te se on tada skalira s kvadratom broja mikrotubula. Na krajevima tih štapova prisutne su proizvoljne sile i momenti sila.



Slika 21: Hipoteza o organizaciji diobenog vretena u metafazi. Svakom paru kinetohornih vlakana, označenim plavom bojom, pridruženo je jedno premosno vlakno, označeno ljubičastom bojom. Dva antiparalelna vlakna, koja čine premosno vlakno, povezana su vezivnim proteinima, označenima crno. Kromosomi su označeni smeđom bojom, a kinetohore crvenom bojom.



Slika 22: Teorijski model koji opisuje snopove mikrotubula u diobenom vretenu. Kinetohorna vlakna od polova do točaka spajanja $\mathbf{r}_{j1}$ i $\mathbf{r}_{j2}$ su označena crnom bojom i slovom p. Kinetohorna vlakna od točaka spajanja do kinetohora $\mathbf{r}_{k1}$ i $\mathbf{r}_{k2}$ su označena ljubičastom bojom i slovom k. Premosno vlakno je označeno zelenom bojom i slovom b.

U našem teorijskom modelu premosno vlakno povezuje dva sestrinska kinetohorna vlakna, slika 22, te se vlakna spajaju u dvije točke spajanja $\mathbf{r}_{\mathrm{j1}}$ i $\mathbf{r}_{\mathrm{j2}}$. Sila tenzije između kinetohora djeluje na svaku od sestrinskih kinetohora i vuče kinetohore i kinetohorna vlakna jedne prema drugima. U lijevom polu djeluju proizvoljna sila i moment sile, dok su sila i moment na desnom polu dobiveni iz uvjeta mehaničke ravnoteže.

Sva tri vlakna su opisana kao elastični tanki štapovi; stoga vrijedi jednadžba (1.2.35) koju smo izveli u poglavlju 1.2, i koja povezuje oblik ta tri štapa sa vanjskim silama koje djeluju na njihovim krajevima. Dva člana na lijevoj strani opisuju savijanje $\kappa\frac{d\mathbf{t}}{ds}\times\mathbf{t}$ i torziju $\tau\frac{d\phi_z}{ds}$. U općenitom slučaju, moment sile okomit na ravninu u kojoj je definiran odsječak konture štapa uzrokuje savijanje, bez promjene relativne orijentacije poprečnih presjeka štapa, torzije. Proizvoljna sila koja djeluje na odsječak konture štapa također uzrokuje svijanje, i to bez torzije. S druge strane, moment sile tangencijalan na odsječak konture štapa uzrokuje promjenu relativne orijentacije poprečnih presjeka štapa, tj. torziju.

Tri vlakna su opisana kao pet elastičnih štapova, slika 22, sa homogenim modulima svijanja κ_i i modulima torzije τ_i. U dodatku C je pokazano da se i moduli torzije u nanižem redu aproksimacije skaliraju sa brojem mikrotubula, jednako kao moduli svijanja, ako je njihovo

vezivanje u snop (vlakno) fleksibilno. Mjerenja modula torzije su za individualne aktinske filamente su provedena u [84], dok moduli torzije mikrotubula još nisu izmjereni. Svih pet elastičnih štapova su opisani duljinom konture s i vektorom $\mathbf{r}(s)$, slika 22. Prvi štap, označen sa $p1$, se proteže između položaja $\mathbf{r}(0)$ i $\mathbf{r}(s_{j1})$, koje predstavljaju pol i prvu točku spajanja. Drugi štap, označen sa $k1$, se proteže između položaja prve točke spajanja $\mathbf{r}(s_{j1})$ i položaja prve kinetohore $\mathbf{r}(s_{k1})$. Treći štap, označen sa b, se proteže između dviju točaka spajanja $\mathbf{r}(s_{j1})$ i $\mathbf{r}(s_{j2})$. Četvrti štap, označen sa $k2$ proteže se između položaja druge kinetohore $\mathbf{r}(s_{k2})$ i položaja druge točke spajanja $\mathbf{r}(s_{j2})$. Peti štap, označen s $p2$ proteže se između položaja druge točke spajanja $\mathbf{r}(s_{j2})$ i drugog pola $\mathbf{r}(L)$. Oblici štapova su opisani statičkom Kirchoffovom jednadžbom,

$$\kappa\mathbf{t}\times\frac{d\mathbf{t}}{ds}+\tau\frac{d\phi}{ds}\mathbf{t}=\mathbf{r}\times\mathbf{F_0}-\mathbf{M_0}, \tag{2.2.1}$$

koja se može napisati kao skup od 5 jednadžbi definiranih u intervalu omeđenim krajnjim točkama svakog od štapova,

$$\kappa_p\mathbf{t}\times\frac{d\mathbf{t}}{ds}+\tau_p\frac{d\phi}{ds}\mathbf{t}=\mathbf{r}\times\mathbf{F}_0-\mathbf{M}_0,\ 0\le s\le s_{j1}, \tag{2.2.2}$$

$$\kappa_k\mathbf{t}\times\frac{d\mathbf{t}}{ds}=-(\mathbf{r}-\mathbf{r}_{j1})\times\mathbf{F}_k+(\mathbf{r}_{k1}-\mathbf{r}_{j1})\times\mathbf{F}_k\ s_{j1}<s\le s_{k1}, \tag{2.2.3}$$

$$\kappa_b\mathbf{t}\times\frac{d\mathbf{t}}{ds}+\tau_\mathrm{b}\frac{d\phi}{ds}\mathbf{t}=(\mathbf{r}-\mathbf{r}_{j1})\times(\mathbf{F}_0+\mathbf{F}_k)-(\mathbf{r}_{k1}-\mathbf{r}_{j1})\times\mathbf{F}_k-\mathbf{M}_0\ s_{j1}\le s\le s_{j2}, \tag{2.2.4}$$

$$\kappa_k\mathbf{t}\times\frac{d\mathbf{t}}{ds}=-(\mathbf{r}-\mathbf{r}_{k2})\times\mathbf{F}_k,\ s_{k2}\le s\le s_{j2}, \tag{2.2.5}$$

$$\kappa_p\mathbf{t}\times\frac{d\mathbf{t}}{ds}+\tau_p\frac{d\phi}{ds}\mathbf{t}=(\mathbf{r}-\mathbf{r}_{j2})\times(\mathbf{F}_0+\mathbf{F}_k)+(\mathbf{r}_{j2}-\mathbf{r}_{j1})\times\mathbf{F}_0-(\mathbf{r}_{k1}-\mathbf{r}_{k2})\times\mathbf{F}_k-\mathbf{M}_0\ s\le s\le L. \tag{2.2.6}$$

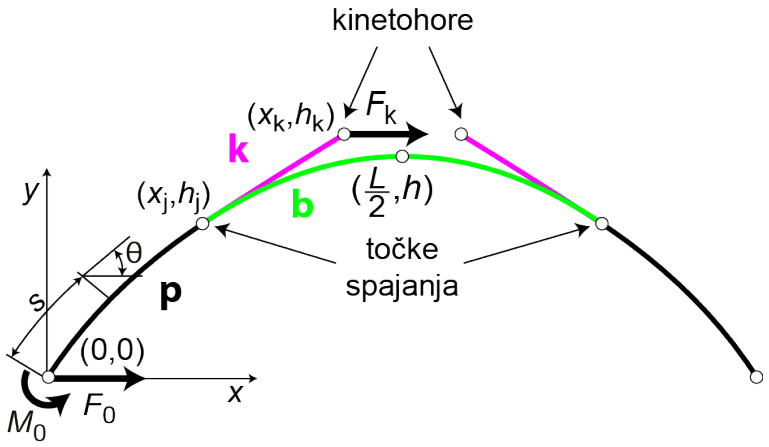
Sila tenzije na kinetohorama ima smjer od jedne sestrinske kinetohore prema drugoj:

$$\mathbf{F_k} = F_k(\mathbf{r_{k2}} - \mathbf{r_{k1}})/|\mathbf{r_{k2}} - \mathbf{r_{k1}}|\,. \tag{2.2.7}$$

2.2.2 Rješenje modela za simetričnu geometriju u dvije dimenzije

Opažanja vanjskih kontura snopova mikrotubula u HeLa i PtK1 stanicama upućuju na činjenicu da su oblici sestrinskih kinetohornih vlakana i premosnog vlakna u vanjskom dijelu diobenog vretena uglavnom ravninski, te isto tako zrcalno simetrični oko metafazne ravnine. Stoga ovdje razmatramo gornji model u dvije dimenzije gdje je $r(s) = (x(s), y(s))$. Također pretpostavljamo da je polovica sustava koji se sastoji od kinetohornih vlakana i premosnog vlakna opisan jednadžbama (2.2.2-2.2.4), dok je druga polovica dobivena zrcalnom simetrijom oko osi $y = x(s_{L/2})$, što je prikazano na slici 23. Oblik štapova u sustavu je opisan Euler-Bernoulijevom jednadžbom, koja je posebni slučaj statičke Kirchoffove jednadžbe u jednoj ravnini,

$$\kappa \mathbf{t} \times \frac{d\mathbf{t}}{ds} = \mathbf{r} \times \mathbf{F}_0 - \mathbf{M}_0. \tag{2.2.8}$$



Slika 23: Teorijski model koji opisuje snopove mikrotubula u jednoj ravnini. Kinetohorno vlakno od pola do točke spajanja (x_j, h_j) je označeno crnom bojom i slovom p. Kinetohorno vlakno od točke spajanja do kinetohore (x_k, h_k) je označeno ljubičastom bojom i slovom k. Premosno vlakno je označeno zelenom bojom i slovom b. Preuzeto iz [66].

U kartezijevim koordinatama $(x(s), y(s))$, Euler-Bernoullijeva jednadžba za sustav od tri štapa se svodi na skup od tri nelinearne diferencijalne jednadžbe drugog reda:

$$\kappa_p \frac{d^2 y_p}{dx^2} = -(M_{0z} + F_{0x} y_p) \left(1 + \left(\frac{dy_p}{dx}\right)^2\right)^{\frac{1}{2}}, \ 0 \leq x \leq x_j, \tag{2.2.9}$$

$$\kappa_k \frac{d^2 y_k}{dx^2} = F_k (y_k - h_k) \left(1 + \left(\frac{dy_k}{dx}\right)^2\right)^{\frac{1}{2}}, \ x_j \leq x \leq x_k, \tag{2.2.10}$$

$$\kappa_b \frac{d^2 y_b}{dx^2} = -(M_{0z} + F_{0x} y_b + F_k (y_b - h_k)) \left(1 + \left(\frac{dy_b}{dx}\right)^2\right)^{\frac{1}{2}} \ x_j \leq x \leq \frac{L}{2}. \tag{2.2.11}$$

Ovdje je h_k vertikalni položaj kinetohore. Krajnje točke intervala predstavljaju krajnje točke štapova p, k, b. Ako znamo parametre $F_{0x},\ F_k,\ x_j,\ x_k,\ L/2,\ M_{0z},\ \kappa_{p,k,b}$, rješenje gornjih triju jednadžbi je jednoznačno određeno sa šest rubnih ili početnih uvjeta. Veza između štapova se ostvaruje ravnotežom sila i momenata sila u točkama spajanja, te uvjetom kontinuiranosti i glatkosti oblika u točki spajanja, što je sadržano rubnim uvjetima navedenim u idućem paragrafu.

Aproksimacija malih kutova U aproksimaciji malih kutova vrijedi $dx \approx ds$, što je ekvivalentno uvjetu $dy_i/dx \ll 1$. Zbog tog uvjeta u gornjim jednadžbama iščezava član $\left(1 + (dy_i/dx)^2\right)^{3/2}$, što pretvara te jednadžbe u linearne. Vidimo da je za kut od 30^o greška koju aproksimacija malih kutova uvodi u zakrivljenost oblika približno 50%. Nelinearne diferencijalne jednadžbe (2.2.9-2.2.11) je moguće analitički riješiti zasebno za svaki od štapova, [83], no izračun analitičkog rješenja nije moguć za sustav s tri štapa. Kako je linearne diferencijalne jednadžbe moguće lako riješiti za sustav od tri štapa, promotrili smo rješenja u aproksimaciji malih kutova.

Rješenja danog sustava su oblika :

$$y_p(x) = A_1 \sin(\omega_1 x + \phi_1) + \frac{M_{0z}}{F_{0x}}, \tag{2.2.12}$$

$$y_k(x) = A_2 \sin(\omega_2 x + \phi_2) - \frac{F_k h_k}{F_{0x}}, \tag{2.2.13}$$

$$y_p(x) = A_3 \sin(\omega_3 x + \phi_3) - \frac{M_{0z}}{F_{0x}} + \frac{F_k h_k}{F_{0x}}, \tag{2.2.14}$$

gdje je $\omega_1 = \sqrt{F_{0x}/\kappa}$, $\omega_2 = \sqrt{F_k/\kappa}$ i $\omega_3 = \sqrt{(F_{0x} + F_k)/\kappa}$. Nametnuli smo rubni uvjet u polu,

$$y_p|_{x=0} = 0, \tag{2.2.15}$$

zatim četiri rubna uvjeta u točki spajanja, koji opisuju kontinuiran i gladak prijelaz između kontura štapova

$$y_p|_{x=x_j} = y_k|_{x=x_j}\,, \tag{2.2.16}$$

$$y_p|_{x=x_j} = y_b|_{x=x_j}\,, \tag{2.2.17}$$

$$\left.\frac{dy_p}{dx}\right|_{x=x_j} = \left.\frac{dy_k}{dx}\right|_{x=x_j}, \tag{2.2.18}$$

$$\left.\frac{dy_p}{dx}\right|_{x=x_j} = \left.\frac{dy_b}{dx}\right|_{x=x_j}, \tag{2.2.19}$$

te rubni uvjet za zrcalnu simetriju

$$\left.\frac{dy_p}{dx}\right|_{x=L/2} = 0. \tag{2.2.20}$$

Može se vidjeti da ovako postavljeni rubni uvjeti općenito tvore nehomogeni linearni sustav s 6 jednadžbi i 6 nepoznanica. Ako pretpostavimo $M_{0z} = 0$, tada linearni sustav postaje homogen, te determinanta tog sustava mora iščezavati. Iz tog uvjeta dobivamo silu u polu, F_{0x}, te oblik koji može imati proizvoljnu skalu u koordinati y. Oblike koje dobivamo kao rješenja ovog veoma pojednostavljenog modela možemo podijeliti u četiri klase:

1) Konveksni oblici, kod kojih je zakrivljenost sva tri štapa negativna. Također, kinetohore se nalaze iznad premosnog vlakna. Takvi oblici su uvijek pod silom kompresije u polu.

2) Konveksni oblici kod kojih se kinetohore nalaze ispod premosnog vlakna. Takvi oblici su pod silom kompresije u polu i tipični su za debelo premosno vlakno.

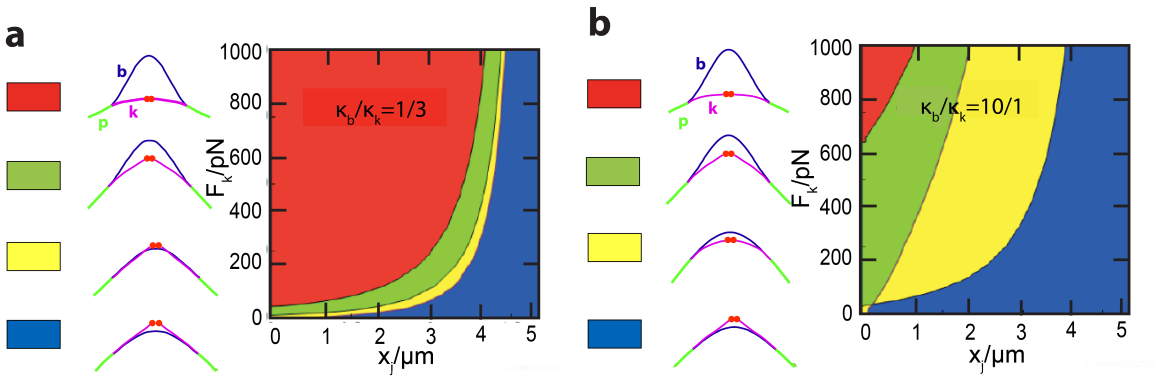
3) Konkavni oblici, kod kojih je kinetohorno vlakno konkavno u blizini pola. Kinetohore se nalaze ispod premosnog vlakna. Takvi oblici su pod silom tenzije u polu.

4) Konkavni oblici, kod kojih je premosno vlakno konkavno u blizini točke spajanja i kinetohore su iznad premosnog vlakna. Takvi oblici su pod silom kompresije u polu.

5) Konkavni oblici, kod kojih je premosno vlakno konkavno u blizini točke spajanja i kinetohore su ispod premosnog vlakna. Takvi oblici su pod silom kompresije u polu.

Za oblike 4) i 5) značajno je da se premosno vlakno savija u konkavni oblik iz dva moguća razloga: velikog razmaka između točaka spajanja ili velike sile na kinetohori.

Na slici 24 je prikazan dvo-parametarski fazni dijagram gdje promatramo silu F_k i položaj točke spajanja x_k, i to za dva ekstremna omjera κ_b/κ_p.



Slika 24: Klase rješenja modela koji opisuje sestrinska kinetohorna vlakna i premosno vlakno u dvije dimenzije. Rješenja su prikazana u $x_j - F_k$ prostoru, u aproksimaciji malih kutova, za omjere modula svijanja štapa b i k a) 1/3 i b) 10/1. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 10$ µm.

Može se vidjeti da za tanko premosno vlakno, $\kappa_b/\kappa_k = 1/3$, postoji prijelazni oblik kod kojeg su kinetohore iznad premosnog vlakna koje je konkavno u blizini točke spajanja. Također,

može se vidjeti za debelo premosno vlakno, $\kappa_b/\kappa_k = 10/1$, postoji prijelazni oblik u kojem su kinetohore ispod premosnog vlakna koje je konveksno.

2.2.3 Aproksimativni izrazi za prijelaze između specifičnih oblika u dvije dimenzije

Nakon što smo klasificirali analitička rješenja modela u dvije dimenzije, u aproksimaciji malih kutova, zanima nas postoje li analitički izrazi koji mogu približno opisati fazne granice u $x_j - F_k$ prostoru između tih rješenja. U tu svrhu smo razvili izraze za oblike štapova p, k i b u polinome najnižeg stupnja, koji zadovoljavaju rubne uvjete i Euler-Bernoullijevu jednadžbu, kao specijalni slučaj statičke Kirchoffove jednadžbe (2.2.1) u polu, točki spajanja, kinetohori i središnjoj točki. U tu svrhu definiran je koordinatni sustav sa ishodištem na kinetohori. U tom sustavu položaj pola je dan s $(-L, -y'_{max})$, položaj točke spajanja s $(-x_0, -y_{max})$ i položaj kinetohore s $(0, 0)$. Također smo pretpostavili da horizontalna udaljenost između kinetohora iščezava. Prvo smo istražili faznu granicu koja razdvaja oblike pod silom tenzije i oblike pod silom kompresije u polu, tj. oblike koji su konkavni u polu i konveksni u polu. Oblici štapova su aproksimirani slijedećim izrazima:

$$y_p(x) = k_0 x + l_0, \quad y_k(x) = k_1 x^3 + l_1 x, \quad y_b(x) = k_2 x^4 + l_2 x^2 + m_2. \tag{2.2.21}$$

Štap p je aproksimiran polinomom prvog stupnja koji prolazi kroz pol i kroz točku spajanja. Štap k je aproksimiran polinomom trećeg stupnja, jer on prolazi kroz kinetohoru (ishodište) i točku spajanja te ima točku infleksije u kinetohori. Štap b je aproksimiran polinomom četvrtog stupnja jer prolazi kroz kinetohoru (ishodište) i točku spajanja, ima maksimum u kinetohori, te postoji relativna razlika u verikalnom položaju u odnosu na kinetohoru m_2. Razlog zašto nismo odabrali polinom prvog stupnja za štap k i polinom drugog stupnja za štap b je taj što zahtijevamo da vrijedi statička Kirchoffova jednadžba u točki spajanja i kinetohori. Taj uvjet se ne zahtijeva za štap pu polu, zbog rubnog uvjeta pivotiranja. U novom koordinatnom sustavu, momenti sila koji djeluju na štapove se transformiraju na slijedeći način:

$$M_p = F_0(y_p(x) + y'_{max}) \tag{2.2.22}$$

$$M_k = -F_k y_k(x) \tag{2.2.23}$$

$$M_b(x) = (F_0 + F_k)y_b(x) + F_0 y'_{max}. \tag{2.2.24}$$

Za faznu granicu koja razdvaja oblike pod silom tenzije i oblike pod silom kompresije u polu zahtijevamo $F_0 = 0$. Iz uvjeta da štap p prolazi kroz pol i točku spajanja dobivamo koeficijente k_0 i l_0. Iz uvjeta da štap k prolazi kroz točku spajanja i zadovoljava jednadžbu Euler-Bernoullija u toj točki dobivamo koeficijente k_1 i l_1. Također zahtijevamo da štap b zadovoljava jednadžbu Euler Bernoullija u polu i točki spajanja, te da prolazi kroz točku spajanja. Na taj način dobivamo koeficijente k_2, l_2 i m_2. Konačno, zahtijevamo da se štapovi p i k, te štapovi p i b, glatko spajaju u točki spajanja $(-x_0, -y_{max})$. Prvi od ta dva uvjeta daje vezu između y_{max} i y'_{max}, dok drugi daje konačni izraz za faznu granicu između oblika pod silom tenzije i kompresije u polu,

$$36\left(\frac{\kappa_b}{\kappa_k}\right)^2 + 3F_k\frac{\kappa_b}{\kappa_k}(7 + 4\frac{\kappa_b}{\kappa_k})x_0^2 + F_k^2(-3 - 5\frac{\kappa_b}{\kappa_k})x_0^4 = 0. \tag{2.2.25}$$

Također smo dobili aproksimativni izraz za faznu granicu između oblika kod kojih su kinetohore iznad premosnih mikrotubula i oblika kod kojih su kinetohore ispod premosnih mikrotubula. Za granični slučaj, tj. na samoj faznoj granici, štapovi k i b se poklapaju u ishodištu, te je $m_2 = 0$, dok ostali koeficijenti u razvoju oblika štapova ostaju isti. No u tom slučaju je F_0 generalno različit od nule. Zahtijevajući iste uvjete za oblike štapova u polu, točki spajanja i kinetohori kao u prethodnom slučaju, dobivamo izraz za granicu između oblika s kinetohorama iznad i oblika s kinetohorama ispod premosnih mikrotubula,

$$-9\frac{\kappa_b}{\kappa_k}(-1 + x_0) - \frac{1}{2}x_0^2(2 + 10\frac{\kappa_b}{\kappa_k}x_0)F_k + \frac{1}{2}(1 + 2\frac{\kappa_b}{\kappa_k})x_0^4(-1 + 2x_0)F_k = 0. \tag{2.2.26}$$

Konačno, dobili smo aproksimativni izraz koji opisuje granicu oblika kod kojih je štap b, ili središnji dio premosnog vlakna, konkavan u blizini točke spajanja ili potpuno konveksan, tj. granicu izvijanja. Očekujemo da je ta fazna granica bliska faznoj granici za pomak kinetohora ispod premosnih mikrotubula, dok god se radi o realističnim omjerima κ_b/κ_k. U graničnom slučaju, tj. na samoj faznoj granici, štap b ima točku infleksije u točki spajanja. Oblici štapova su sada zadani aproksimativnim izrazima,

$$y_p(x) = n_0x^2 + k_0x + l_0, \tag{2.2.27}$$

$$y_k(x) = k_1x^3 + l_1x, \tag{2.2.28}$$

$$y_b(x) = k_2x^4 + l_2x^2 + m_2. \tag{2.2.29}$$

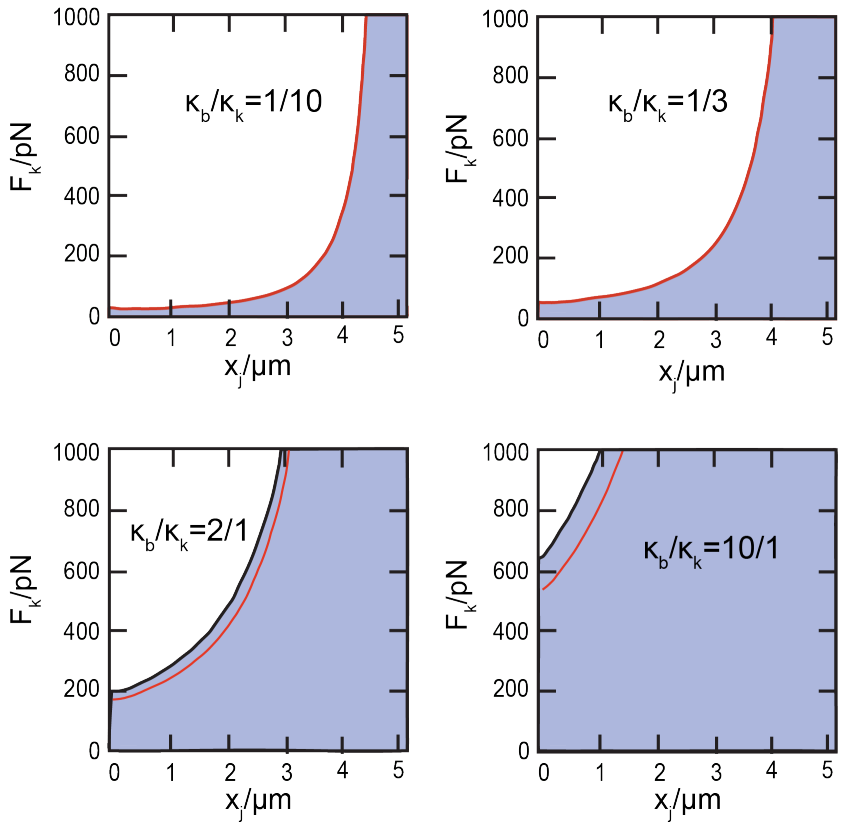
Oblici štapova k i b su aproksimirani na isti način kao i prije, jednadžbom (2.2.21), dok u razvoj štapa p dolazi i član drugog reda. Razlog tome je što želimo dobiti i netrivijalna rješenja za oblik štapa p, a ne samo trivijalno rješenje $k_2 = 0, l_2 = 0$, koje se dobiva ako oblik štapa p razvijemo samo do prvog reda. Sada uz uvjete koje su oblici štapova morali zadovoljiti u prijašnja dva paragrafa zahtijevamo i uvjet da štap p zadovoljava statičku Kirchoffovu jednadžbu u točki spajanja. Na taj način dobivamo izraz za faznu granicu između oblika s djelomično konkavnim i potpuno konveksnim središnjim dijelom premosnog vlakna,

$$A + BF_k + CF_k^2 = 0, \tag{2.2.30}$$

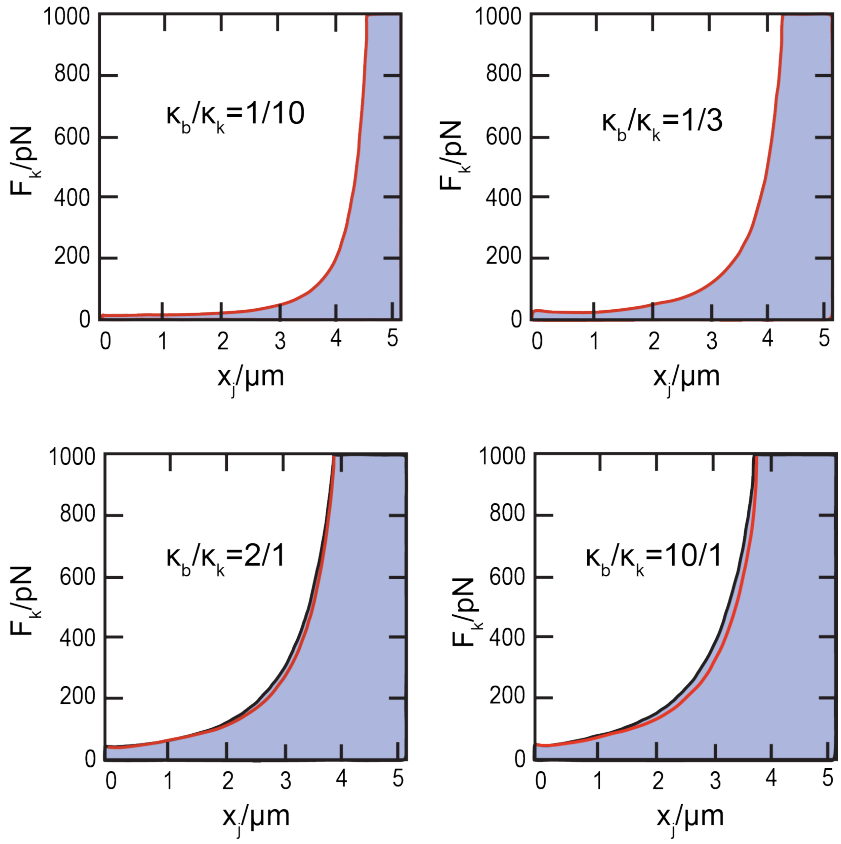
$$A = 72\left(1 + \frac{\kappa_b}{\kappa_k}\right)(L - x_0), \tag{2.2.31}$$

$$B = 6x_0\frac{\kappa_k}{\kappa_b}(6L^2\frac{\kappa_b}{\kappa_k} + L(-5 - 13\frac{\kappa_b}{\kappa_k} + 4\left(\frac{\kappa_b}{\kappa_k}\right)^2)x_0 + 2(1 - 2\frac{\kappa_b}{\kappa_k})\frac{\kappa_b}{\kappa_k}x_0^2), \tag{2.2.32}$$

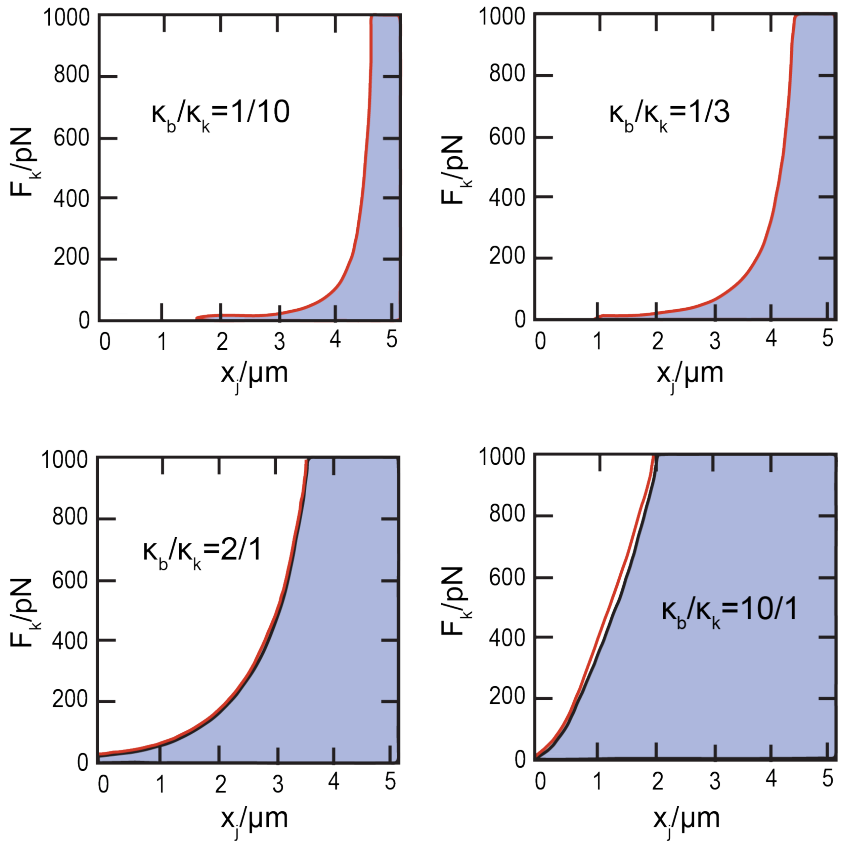
$$C = -\frac{\kappa_k}{\kappa_b} 5(L - x_0) x_0^3 (3L + (-1 + 2\frac{\kappa_b}{\kappa_k}) x_0) F_k^2. \tag{2.2.33}$$



Slika 25: Fazne granice, u $x_j - F_k$ prostoru, između oblika na koje djeluju sile tenzije i oblika na koje djeluju sile kompresije, za model snopova mikrotubula u dvije dimenzije. Fazne granice su prikazane za četiri različita omjera modula svijanja štapova b i k. Egzaktna numerička fazna granica je prikazana crnom linijom, a aproksimativna fazna granica je prikazana crvenom linjom. Za duljinu diobenog vretena je odabrano $L = 10$ μm.



Slika 26: Fazne granice, u $x_j - F_k$ prostoru, između oblika kod kojih su kinetohore položene iznad i ispod štapa b, za model snopova mikrotubula u dvije dimenzije. Fazne granice su prikazane za četiri različita omjera modula svijanja štapova b i k. Egzaktna numerička fazna granica je prikazana crnom linijom, a aproksimativna fazna granica je prikazana crvenom linjom. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 10$ μm.



Slika 27: Fazne granice, u $x_j - F_k$ prostoru, između oblika kod kojih je štap b konkavan i konveksan u blizini točke spajanja, za model snopova mikrotubula u dvije dimenzije. Fazne granice su prikazane za četiri različita omjera modula svijanja štapova b i k. Egzaktna numerička fazna granica je prikazana crnom linijom, a aproksimativna fazna granica je prikazana crvenom linjom. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 10$ µm.

Na slikama 25, 26 i 27 smo prikazali slaganje egzaktne numeričke i aproksimativne analitičke fazne granice između različitih oblika, prikazanih crnom i crvenom linijom respektivno, i to redom između oblika pod tenzijom i kompresijom, između oblika s kinetohorama iznad i ispod premosnih mikrotubula, te između oblika s djelomično konkavnim i potpuno konveksnim srednjim dijelom premosnog vlakna. Izračunali smo aproksimativne fazne granice za omjere $\kappa_b/\kappa_k = 1/10,\ 1/3,\ 2/1,\ 10/1$. Ono što možemo vidjeti je da aproksimativne fazne granice dobro opisuju navedene prijelaze između oblika, i to čak za ekstremni, ne-fizikalni omjer $\kappa_b/\kappa_k = 10/1$.

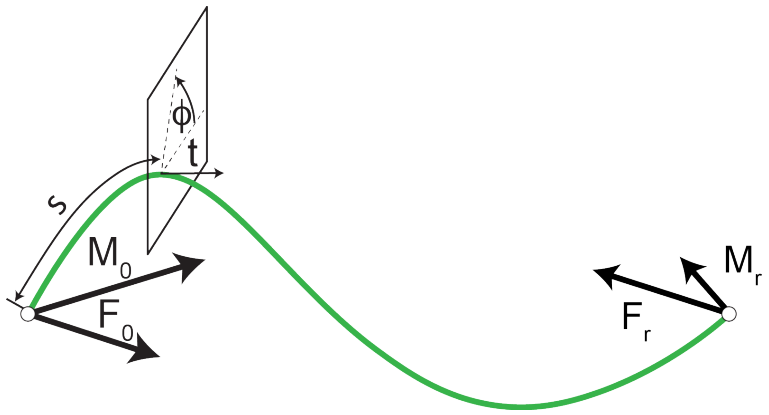
2.2.4 Parametrizacija modela za vanjski oblik diobenog vretena

Koristeći naš model, mi želimo iz oblika kinetohornih vlakana i premosnog vlakna odrediti sile i momente sila koji djeluju u polovima i na kinetohorama, iako je oblik posljedica tih sila. Razlog tome je taj što je oblik diobenog vretena lako mjerljiv, dok sile u diobenom vretenu to nisu, [70]. Koristeći snimke horizontalnih diobenih vretena, precizno smo odredili konture kinetohornih vlakana i premosnog vlakna, te iz njih izvrijednili najrobusnije geometrijske parametre oblika: kut u polu, kut na kinetohori, duljinu i širinu diobenog vretena te horizontalni položaj kinetohore i debljinu premosnog vlakna. Koristili smo potom geometrijske parametre i poznati modul svijanja mikrotubula kako bismo ograničili dozvoljeno područje sila na kinetohori i položaja točaka spajanja. Stoga su geometrija i poznati modul svijanja mikrotubula ulazni parametri, a položaj točke spajanja i sila na kinetohori izlazni parametri modela.

2.2.5 Rješenje modela za jedno vlakno u tri dimenzije

U prethodnom odjeljku smo razmatrali specifične oblike u dvije dimenzije, koje ćemo izabrati za modeliranje vanjskih snopova mikrotubula u diobenom vretenu. No naši eksperimenti upućuju na to kako snopovi mikrotubula u sredini diobenog vretena mogu poprimiti i oblike u tri dimenzije, što je razlog zašto ćemo promotriti i općeniti model, koji uključuje postojanje torzije u sustavu. Za postojanje torzije, nužno je postojanje momenta sile koji je paralelan s konturom oblika. Jednadžba (1.2.37) nam govori da komponenta momenta paralelna s konturom oblika mora biti očuvana duž konture. Kako bismo bolje razumjeli parametarski prostor modela u tri dimenzije, uvesti ćemo pojednostavljenje u kojem modeliramo samo jedno vlakno, reprezentirano kontinuiranim tankim štapom. Ta pretpostavka je identična pretpostavci da su točke spajanja infinitezimalno blizu jedna drugoj. Naša opažanja živih i fiksiranih stanica, uz metodu svjetlosne i super-rezolucijske fluorescencijske konfokalne mikroskopije, potvrđuju tu pretpostavku. Dva kinetohorna vlakna i jedno premosno vlakno modeliramo kao tanki elastični štap uniformnog modula svijanja κ i modula torzije τ. Ovdje smo pretpostavili da nema razlike između premosnog i kinetohornog vlakna, što opravdavamo opažanjem da je odmak premosnog vlakna od kinetohora zanemariv u unutrašnjem dijelu diobenog vretena. Valja primijetiti da bez postojanja premosnog vlakna ne bismo mo-

gli modelirati par kinetohornih vlakana kao kontinuirani objekt. Konturu štapa opisujemo radijalnim vektorom $\mathbf{r}(s)$. Normalizirani vektor tangente je dan s $\mathbf{t} = d\mathbf{r}/ds$. Kut torzije $\phi(s)$ opisuje orijentaciju poprečnog presjeka štapa duž konture štapa. Model je prikazan na slici 28.



Slika 28: Teorijski model koji opisuje jedno vlakno u tri dimenzije.

Svijanje i torzija elastičnog štapa su uzrokovani silom $\mathbf{F}_0$ i momentom sila $\mathbf{M}_0$ na lijevom kraju, te su opisani statičkom Kirchoffovom jednadžbom (2.2.1). Sile i momenti sila na desnom kraju su zadani ravnotežom sila $\mathbf{F_r} = -\mathbf{F_0}$ i $\mathbf{M_r} = -\mathbf{M_0} + \mathbf{L} \times \mathbf{F_0}$, gdje je vektor $\mathbf{L}$ zadan početnom točkom na lijevom kraju i završnom točkom na desnom kraju elastičnog štapa. Ako se zapiše po komponentama, gornja jednadžba ima jedinstveno rješenje za četiri rubna uvjeta, ako su poznati parametri F_{0x}, F_{0y}, F_{0z}, M_b, M_{tw}, κ i τ. Rubni uvjeti se dobivaju tako da zadamo polove u točkama $(0, 0, 0)$ i $(L, 0, 0)$.

Aproksimacija malih kutova Gornji model smo riješili u aproksimaciji malih kutova, kako bismo bolje razumjeli na koje parametre oblika utječe komponenta momenta sile koja uzrokuje svijanje a na koje komponenta momenta sile koja uzrokuje torziju. U daljnjem tekstu ćemo prvu komponentu nazivati moment svijanja a drugu komponentu moment torzije. Analitička rješenja bez aproksimacije malih kutova su dobivena u klasičnom radu [83]. Naša je hipoteza da moment torzije potječe od djelovanja molekularnih motora prisutnih duž snopa mikrotubula, dok za moment svijanja smatramo da nastaje kao pasivna reakcija zbog

učvršćenja mikrotubula u polovima. Stoga je zanimljivo razdvojiti ta dva utjecaja na oblik snopa mikrotubula. U aproksimaciji malih kutova možemo napisati dekompoziciju momenta sile u svakoj točki konture na moment svijanja, $\mathbf{M}_{\mathrm{b}}$, i moment torzije, $\mathbf{M}_{\mathrm{tw}}$,

$$\mathbf{M_0} = M_b\hat{\mathbf{z}} + M_{tw}\hat{\mathbf{x}}. \tag{2.2.34}$$

Kako u aproksimaciji malih kutova vrijedi $s \approx x$, to ujedno znači da komponente položaja možemo zapisati kao razvoj oko ravnog štapa:

$$x = x_0 + \epsilon x_1 + \epsilon^2 x_2 + .., \tag{2.2.35}$$

$$y = \epsilon y_1 + \epsilon^2 y_2 + ..., \tag{2.2.36}$$

$$z = \epsilon z_1 + \epsilon^2 z_2 + ... \tag{2.2.37}$$

Po istom parametru ϵ možemo razviti i komponente sila i momenata sila. U prvom redu računa smetnje tada dobivamo tri jednadžbe za oblik tankog elastičnog štapa:

$$\tau\frac{d\phi}{ds} = -M_{tw,} \tag{2.2.38}$$

$$-\kappa z''(x) + \tau\frac{d\phi}{ds}y'(x) = F_{0x}z(x) - F_{0z}x, \tag{2.2.39}$$

$$\kappa y''(x) + \tau\frac{d\phi}{ds}z'(x) = -F_{0x}y(x) + F_{0y}x - M_b. \tag{2.2.40}$$

Detalji ovog izvoda dani su u dodatku A.2. Ako pretpostavimo da je kut između momenta svijanja $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}$ na lijevom i momenta svijanja $\mathbf{M}_{\mathrm{br}}$ desnom kraju θ, tada vrijedi za silu na lijevom kraju:

$$\mathbf{F}_0 = F_{0x}\hat{\mathbf{x}} + (M_{br}\cos(\theta) + M_{bl})/L\hat{\mathbf{y}} - M_{br}\sin(\theta)/L\hat{\mathbf{z}}. \tag{2.2.41}$$

Rješenja jednadžbi (2.2.38-2.2.40) su analitička i dana s

$$y(x) = A_1 \sin(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}) \cos(\frac{\omega_2 x + \phi_2}{2}) + A_2 \cos(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}) \sin(\frac{\omega_2 + \phi_2}{2}) + \frac{M_{0z}}{F_{0x}} - \frac{F_{0y} x}{F_{0x}} - \frac{M_{tw} F_{0z}}{F_{0x}^2}, \tag{2.2.42}$$

$$z(x) = A_1 \sin(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}) \sin(\frac{\omega_2 x + \phi_2}{2}) - A_2 \cos(\frac{\omega_1 x + \phi_1}{2}) \cos(\frac{\omega_2 x + \phi_2}{2}) + \frac{M_{tw} F_{0y}}{F_{0x}^2} - \frac{M_{0y}}{F_{0x}} + \frac{F_{0z} x}{F_{0x}}. \tag{2.2.43}$$

Ovdje su ω_1 i ω_2 veliki i mali valni broj, dani s

$$\omega_1 = \frac{\sqrt{M_{0x}^2 + 4\kappa F_{0x}}}{\kappa}, \tag{2.2.44}$$

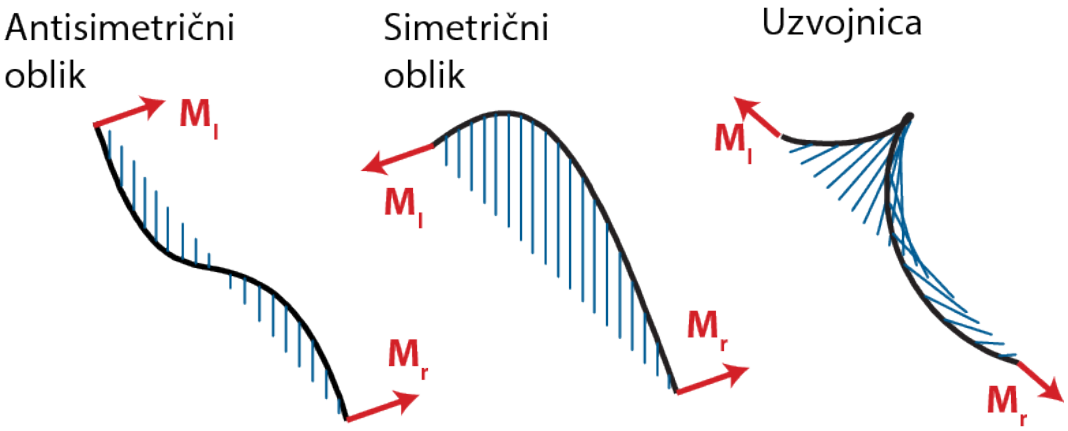
$$\omega_2 = \frac{M_{0x}}{\kappa}.$$

Ako su poznati ulazni parametri modela $F_{0x}, F_{0y}, F_{oz}, M_{0x}, M_{0y}, M_{0z}, L$ i κ, izlazni parametri oblika A_1, A_2, ϕ_1, ϕ_2 su zadani rubnim uvjetima:

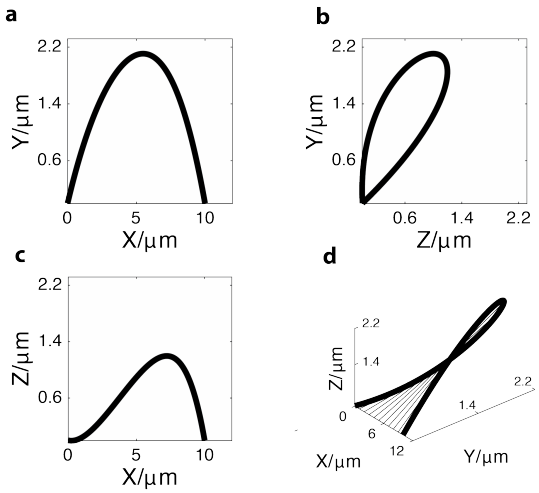
$$r(0) = 0,\ r(L) = L\hat{x}. \tag{2.2.45}$$

Iz jednadžbi općenitog modela za jedinstveni štap u tri dimenzije dobiva se mnoštvo mogućih oblika, ovisno o silama i momentima sila koje djeluju na njihovim krajevima. Reprezentativni oblici su prikazani na slici 29. Lijevo je prikazan S-oblik u dvije dimenzije, koji je rezultat djelovanja dvaju momenata sila okomitih na konturu štapa (momenata svijanja), koji su međusobno paralelne orijentacije. U sredini je prikazan C-oblik u dvije dimenzije, koji također nastaje djelovanjem dvaju momenata svijanja, ali međusobno antiparalelne orijentacije. Na krajevima S-oblika su prisutne sile okomite na spojnicu polova, dok na krajevima C-oblika one iščezavaju. Kombinacija simetričnog C-oblika i antisimetričnog S-oblika daje općeniti asimetrični oblik u dvije dimenzije. Ako na štap djeluju momenti sila paralelni s konturom štapa (momenti torzije), dobivamo heliks (uzvojnicu). Kombinacija sva tri slučaja daje općeniti helikoidni oblik u tri dimenzije. Taj oblik ćemo u odjeljku usporediti s eksperimentalno

izmjerenim snopovima mikrotubula u fiksiranim HeLa stanicama.

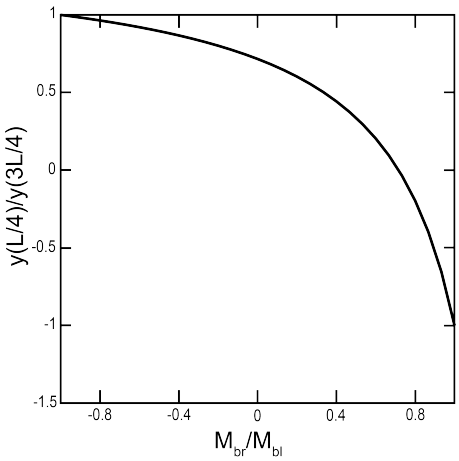


Slika 29: Tri karakteristična rješenja modela za jedno vlakno u tri dimenzije.



Slika 30: Općeniti oblik u tri dimenzije koji opisuje tipični snop mikrotubula u sredini diobenog vretena. a) Nacrt. b) Tlocrt. c) Bokocrt. d) Trodimenzionalni prikaz. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 10\ \mu m$, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNµm^2. Momenti svijanja na lijevoj i na desnoj strani međusobno zatvaraju kut $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}} \cdot \mathbf{M}_{\mathrm{br}} = \cos(\pi/6)$ i njihov međusobni omjer iznosa je $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}/\mathbf{M}_{\mathrm{br}} = 0.4$. Sila u smjeru spojnice polova je jednaka $F_{0x} = 160$ pN, a moment svijanja na lijevom kraju je jednak $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}} = 200$ pNµm. Moment torzije je jednak $\mathbf{M}_{\mathrm{tw}} = 280$ pNµm.

Na slici 30 prikazan je općeniti oblik u tri dimenzije, kod kojeg momenti svijanja na lijevoj i na desnoj strani međusobno zatvaraju kut $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}} \cdot \mathbf{M}_{\mathrm{br}} = \cos(\pi/6)$ i čiji je međusobni omjer iznosa $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}/\mathbf{M}_{\mathrm{br}} = 0.4$. Sila u smjeru spojnice polova je zadana uvjetom da kut u lijevom polu bude $\mathbf{t}(0,0,0) \cdot \hat{\mathbf{x}} = \cos(20^{\mathrm{o}})$. Sile okomite na spojnicu polova uravnotežuju momente svijanja na lijevom i desnom kraju. Moment torzije je jednak $\mathbf{M}_{\mathrm{tw}} = 280$ pNμm. Takav općeniti i asimetrični oblik opažamo u našim eksperimentima. Zanima nas kako se mijenja asimetrija oblika pri prijelazu iz ravninskog C-oblika u ravninski S-oblik. Prijelaz je izveden mijenjanjem veličine momenta svijanja $\mathbf{M}_{\mathrm{br}}$ na desnom kraju, pri čemu zadržavamo njegovu orijentaciju. Za mjeru asimetrije uzeli smo omjer $y(3L/4)/y(L/4)$. Vrijednost tako definirane asimetrije za C-oblik je 0, je vrijednost asimetrije za S-oblik 1. Valja naglasiti da sa prijelazom iz C- u S- oblik promjena asimetrije ne ovisi o iznosu momenta svijanja na lijevom kraju, slika 31.

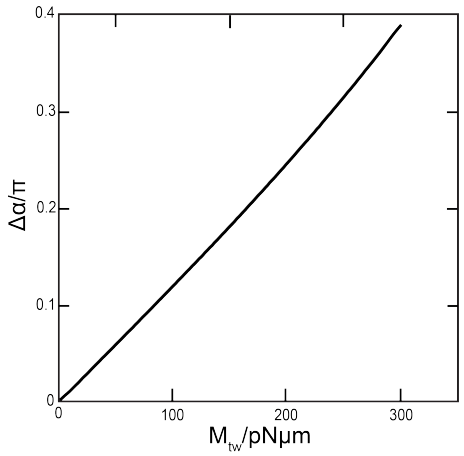


Slika 31: Mjera asimetrije tankog štapa u ovisnosti o iznosu momenta svijanja na desnom kraju. Momenti svijanja na lijevom i desnom kraju leže na istom pravcu, te oblik ostaje u jednoj ravnini. Moment svijanja na lijevom kraju je fiksan. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 12$ μm, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNμm^2

Razlog tome je taj što moment svijanja na lijevom kraju dolazi kao faktor koji množi funkcijsku ovisnost o preostalim parametrima modela, te se taj faktor dokida u omjeru. Kako bismo okarakterizirali oblike u tri dimenzije, uvodimo kutni pomak $\Delta\alpha$ definiran na način:

$$\Delta\alpha = \arccos\left(\frac{(\mathbf{t}(s=0) - \mathbf{t}(s=0)\cdot\hat{\mathbf{x}})\cdot(\mathbf{t}(s=L) - \mathbf{t}(s=L)\cdot\hat{\mathbf{x}})}{|\mathbf{t}(s=0) - \mathbf{t}(s=0)\cdot\hat{\mathbf{x}}|\,|\mathbf{t}(s=L) - \mathbf{t}(s=L)\cdot\hat{\mathbf{x}}|}\right) \tag{2.2.46}$$

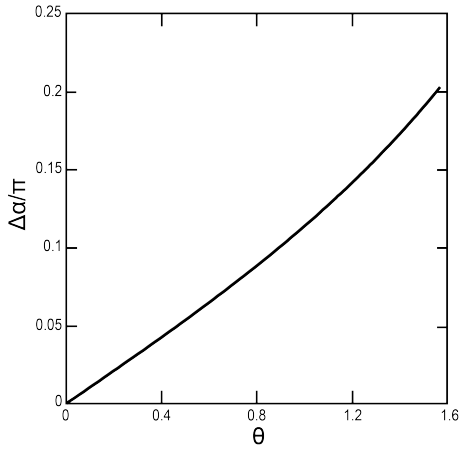
Kutni pomak $\Delta\alpha$ je najmanji kut koji opiše kontura oblika od točke $x = 0$ do točke $x = L$, i to u yz ravnini. Smatramo da je $\Delta\alpha$ dobra kvantitativna mjera za odstupanje općenitog oblika od oblika u dvije dimenzije. Za oblike u dvije dimenzije kutni pomak je jednak 0, dok je za uzvojnicu kutni pomak jednak π. Zanimljivo je da pri prijelazu iz ravninskog C-oblika u helikoidni oblik, kutni pomak slijedi proporcionalnu ovisnost o momentu torzije, $\mathbf{M}_{tw}$, slika 32. Kao i prije, kutni pomak ne ovisi o iznosu momenta svijanja na lijevom kraju, s obzirom da je taj iznos faktor koji množi funkcijsku ovisnost y i z komponenta položaja, te se zbog toga dokida pri određivanju kutnog pomaka. Približno proporcionalna ovisnost momenta torzije i angularnog pomaka opisuje njihovu međusobnu ekvivalentnost, gdje su $\mathbf{M}_{tw}$ i $\Delta\alpha$ uzrok i posljedica, respektivno.



Slika 32: Promjena kutnog pomaka $\Delta\alpha$ sa povećanjem momenta torzije, za sustav s momentima svijanja na lijevom i desnom kraju koji su jednakog iznosa i antiparalelne orijentacije. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 10$ µm, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNµm^2.

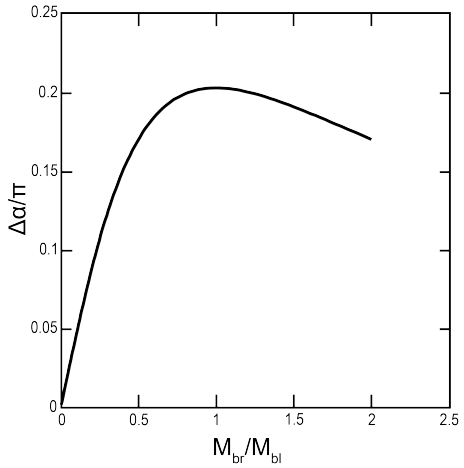
Kako je kutni pomak $\Delta\alpha$ jednoznačna geometrijska karakteristika rješenja našeg modela, zanima nas kako se on mijenja pri prijelazu iz ravninskog C-oblika u asimetrični oblik, kod čemu su momenti svijanja na lijevom i desnom polu, $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}$ i $\mathbf{M}_{\mathrm{br}}$, jednaki i pod međusobnim kutom od $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}\cdot\mathbf{M}_{\mathrm{br}} = \cos(\theta)$. Na slici 1.1.4 je prikazana promjena kutnog pomaka sa

povećanjem kuta između momenata svijanja na desnom i lijevom kraju. Radi jednostavnosti, pretpostavili smo da sile u smjeru spojnice polova $\mathbf{F}_{0\mathrm{l}}$ i $\mathbf{F}_{0\mathrm{r}}$, te moment torzije $\mathbf{M}_{\mathrm{tw}}$ iščezavaju.



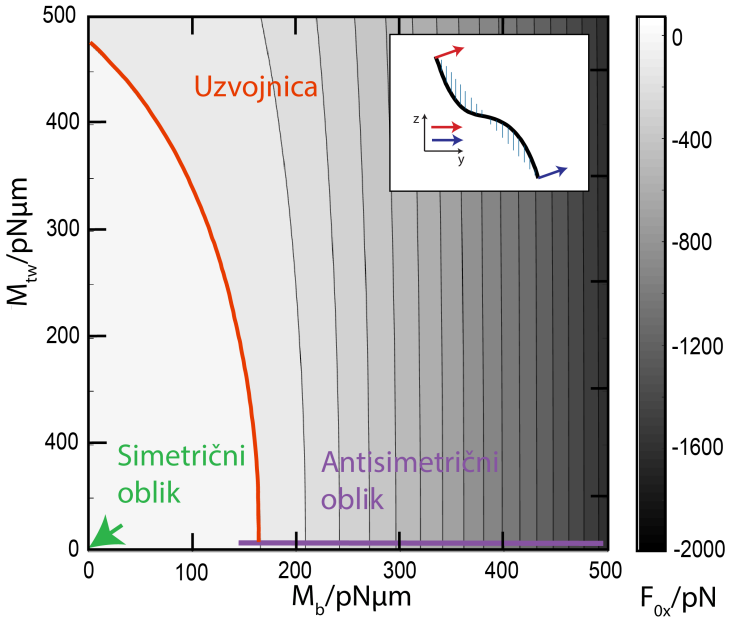
Slika 33: Promjena kutnog pomaka $\Delta\alpha$ sa rotacijom momenta svijanja na desnom kraju, dok je moment svijanja na lijevom kraju fiksan. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 10$ µm, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNµm^2. Ovaj graf i ujedno pokazuje mjeru pogreške aproksimacije malih kuteva. Bez te aproksimacije, za postizanje konačnog kutnog pomaka nužan je moment torzije.

Iz slike 33 vidimo kako međusobni kut između momenata svijanja na desnom i lijevom polu može proizvesti oblik u tri dimenzije, iako moment torzije iščezava, što je rezultat koji dobivamo zbog pogreške u aproksimaciji malih kutova. Naime, iako moment torzije iščezava, u aproksimaciji malih kuteva, skalarni produkt momenta svijanja i vektora tangente na konturu u polovima ne mora nužno iščezavati. Konačno, proučili smo promjenu kutnog pomaka $\Delta\alpha$ sa povećanjem momenta svijanja $\mathbf{M}_{\mathrm{br}}$ na desnom polu, pri čemu je zadano da momenti svijanja na lijevom i desnom polu, $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}$ i $\mathbf{M}_{\mathrm{br}}$, međusobno zatvaraju kut $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}} \cdot \mathbf{M}_{\mathrm{br}} = \cos(\pi/2)$, slika 34. Kao i prije, pretpostavili smo da moment torzije $\mathbf{M}_{\mathrm{tw}}$ i sila u polu $\mathbf{F}_{0x}$ iščezavaju u oba pola. Uočavamo da moment svijanja na desnom polu može proizvesti, jednako kao i moment torzije, helikoidni oblik s maksimalnim kutnim pomakom od $\Delta\alpha = 0.2\pi$. Kada moment svijanja na desnom kraju postane veći od momenta svijanja na lijevom kraju, kutni se pomak ponovno smanjuje, uslijed simetrije sustava na zamjenu polova.



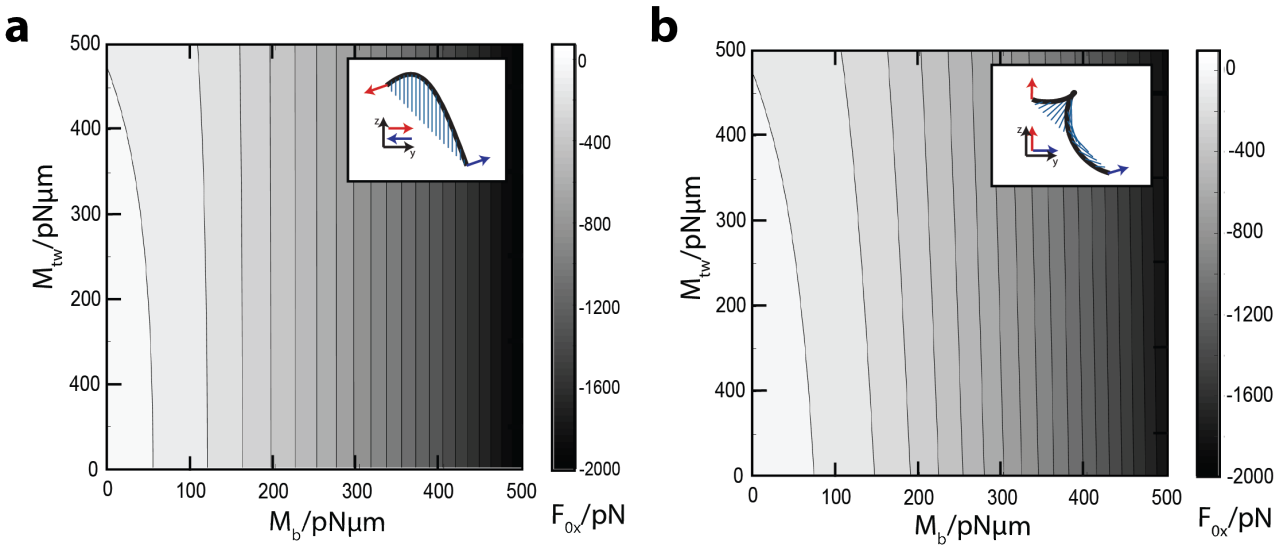
Slika 34: Promjena kutnog pomaka $\Delta\alpha$ sa povećanjem momenta svijanja na desnom kraju, u sustavu sa međusobno okomitom orijentacijom momenata svijanja. Moment svijanja na lijevom kraju je fiksan. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 10$ µm, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNµm^2.

Ispitali smo puni parametarski prostor za helikoidne oblike uz uvjet da su momenti svijanja na lijevom i desnom polu, $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}$ i $\mathbf{M}_{\mathrm{br}}$, međusobno paralelni. U našoj analizi parametarskog prostora zadali smo kut u polu $\mathbf{t}(0,0,0)\cdot\hat{\mathbf{x}} = \cos(20^{\mathrm{o}})$. Razlog odabira ovakvog iznosa kuta je taj što je to gornja granica na kojoj se može primijenjivati uspješno aproksimacija malih kutova, dok je taj kut opažen u velikom broju primjera u našim eksperimentima. Dobili smo da helikoidni oblici mogu postojati pod tenzijskim i kompresivnim silama u smjeru spojnice polova, slika 35. Negativne vrijednosti odgovaraju silama tenzije a pozitivne silama kompresije. Crvenom linijom je označeno područje bez sile u smjeru spojnice polova, koje odgovara oblicima koji imaju kutni pomak $\Delta\alpha = \pi$, koji odgovara uzvojnici. Plavom linijom je označeno područje S-oblika, a zelenom strelicom područje C-oblika u faznom prostoru. Valja napomenuti da oblici na koje djeluje sila tenzije imaju kutni pomak $\Delta\alpha > \pi$, dok oblici na koje djeluje sila kompresije imaju kutni pomak $\Delta\alpha < \pi$. Kada moment torzije iščezava, a moment svijanja je manji od 140 pNµm, sila koja djeluje u smjeru spojnice je uvijek kompresivna i odgovara riješenju za silu kompresije C-oblika iste duljine. Ta vrijednost se dobiva analitički, tako da se zahtijeva da rješenje modela predstavlja S-oblik, koji ima zadani kut u polu, i silu kompresije jednaku sili kompresije C-oblika. Ako je moment torzije veći od 450 pNµm, na oblike djeluje samo sila tenzije. Ta vrijednost je dobivena numerički.

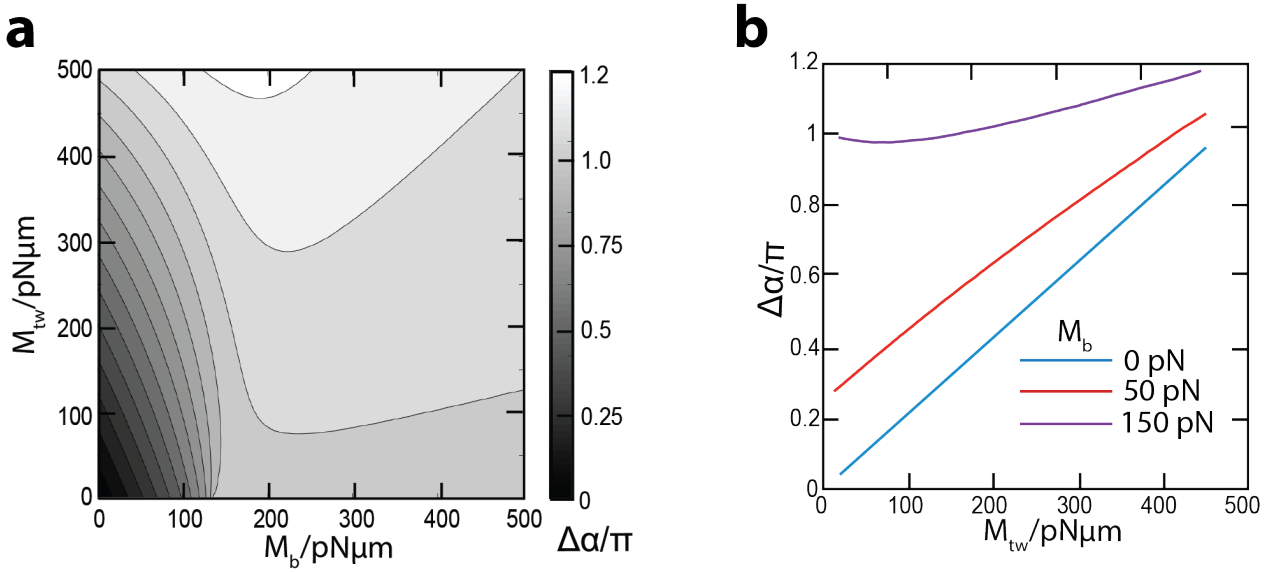


Slika 35: Prikaz sile u polu u smjeru spojnice polova u $M_{tw} - M_b$ prostoru, za paralelnu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom polu. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 12$ µm, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNµm^2.

Istražili smo dodatno fazni prostor za C- i S- oblike, uz uvjet da su momenti svijanja $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}$ i $\mathbf{M}_{\mathrm{br}}$ međusobno antiparalelni. Dobiveni su također oblici pod silama tenzije i kompresije, pri čemu prijelaz u oblike sa tenzijskim silama postoji za manje iznose momenata svijanja $\mathbf{M}_{\mathrm{bl}}$ i $\mathbf{M}_{\mathrm{br}}$ nego u slučaju paralelnih momenata svijanja. Na slici 37, panel a), pokazan je fazni dijagram kutnog pomaka $\Delta\alpha$ u ovisnosti o dva parametra modela M_{tw} i M_b, uz pretpostavku da su momenti svijanja u polovima paralelne orijentacije. Iz faznog dijagrama ponovno vidimo da oblik uzvojnice ima silu u polovima jednaku nuli. Na toj istoj slici, panel b), vidimo da oblici sa momentom svijanja blizu 150 pNµm poprimaju konačni kutni pomak za isčezavajući moment torzije, što dolazi zbog toga što model daje približni C-oblik, koji ima u polovima momente svijanja sa komponentom u smjeru tangente na oblik. Na panelu b) je prikazan kutni pomak u ovisnosti o momentu torzije za tri različita momenta svijanja.

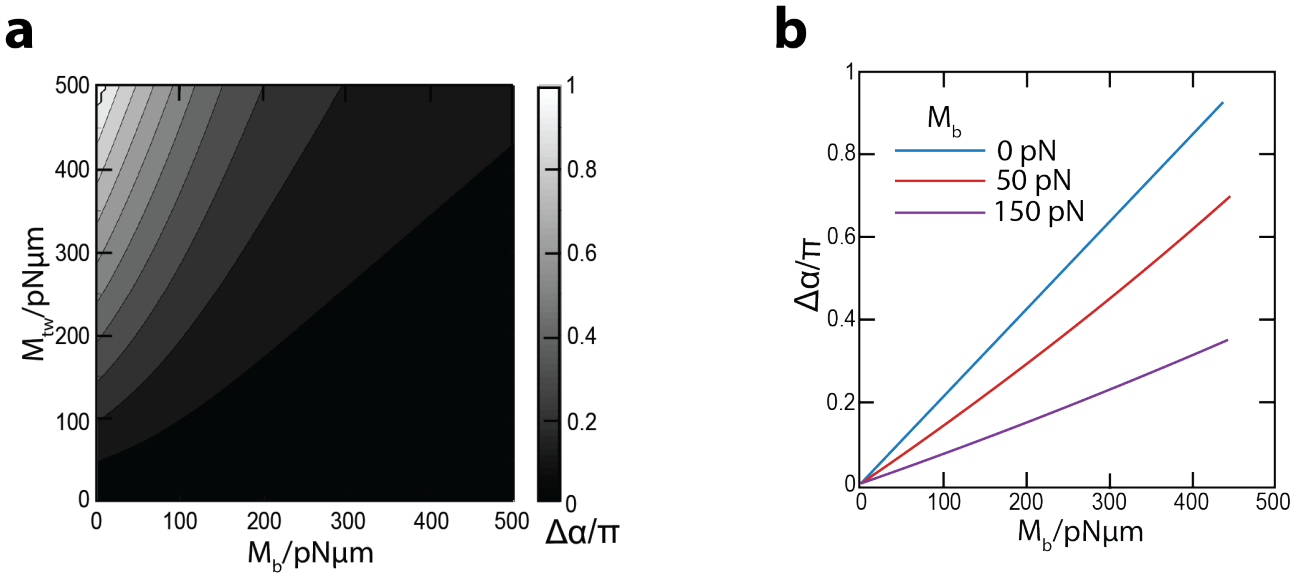


Slika 36: Sila u smjeru spojnice u smjeru polova, u ovisnosti o momentu svijanja i momentu torzije za a) antiparalelnu orijentaciju i b) okomitu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom polu. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 12$ ¯m, a za modul svijanja $\kappa = 900$ pNμm^2.



Slika 37: Kutni pomak $\Delta\alpha$ za paralelnu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom polu a) Kutni pomak $\Delta\alpha$ u ovisnosti o momentu torzije i momentu svijanja. b) Kutni pomak $\Delta\alpha$ za tri iznosa momenta svijanja. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 12$ μm, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNμm^2.

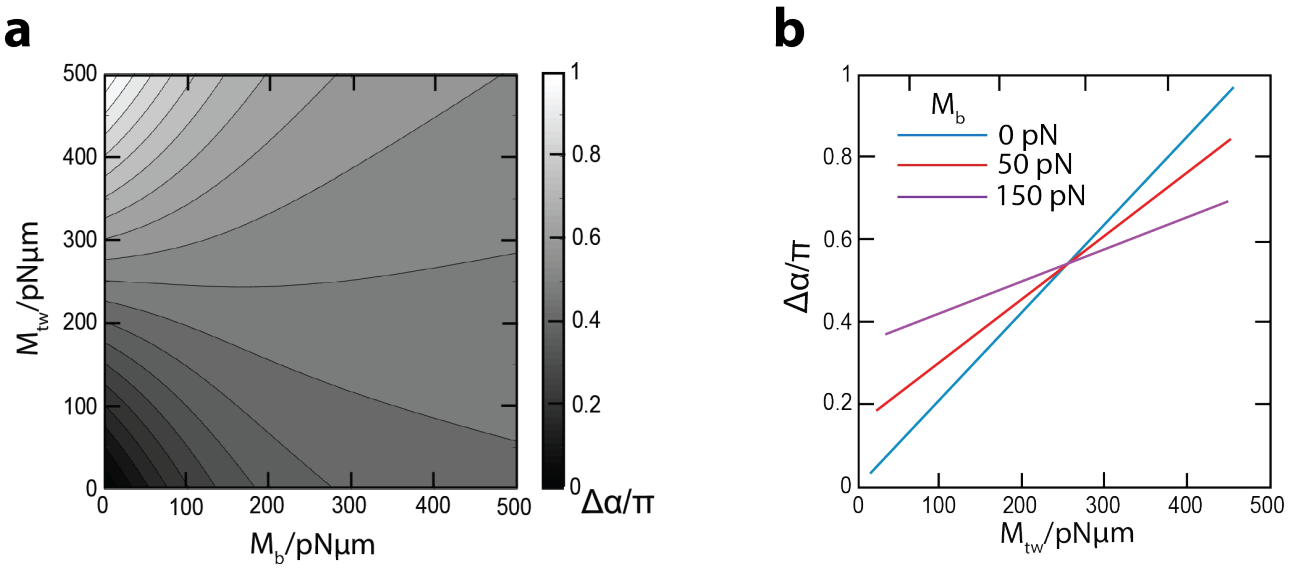
Radi potpunosti, istražili smo kutni pomak $\Delta\alpha$ za antiparalelnu orijentaciju momenata svijanja u oba pola, slika 38, panel a). Dobili smo da, suprotno od oblika sa paralelnom orijentacijom momenata svijanja u polovima, helikoidalni oblici postoje za manje iznose momenta svijanja, M_b. Drugim riječima, C- oblici su stabilniji od S- oblika ako uvedemo moment torzije u sustav, za slučaj kada su kod C- i S- oblika već prisutni momenti svijanja. Detaljnije se to uočava na istoj slici, panel b), gdje je prikazan kutni pomak u ovisnosti o torziji za tri različita momenta svijanja.



Slika 38: Kutni pomak $\Delta\alpha$ za sustav s jednakim iznosima i antiparalelnom orijentacijom momenata svijanja na lijevom i desnom kraju. a) Kutni pomak $\Delta\alpha$ u ovisnosti o momentu torzije i momentu svijanja. b) Kutni pomak $\Delta\alpha$ za tri iznosa momenta svijanja. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost 12 µm, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNµm^2.

Veća stabilnost C-oblika s obzirom na moment torzije u odnosu na S-oblik je u skladu s opažanjima oblika snopova mikrotubula u stanicama sisavaca. Opaža se pojava većina oblika u tri dimenzije u središnjem dijelu diobenog vretena, gdje se može realizirati antisimetrično učvršćenje kinetohornih vlakana u polovima diobenog vretena, što je ujedno i uvjet za for-

miranje S-oblika. Stoga u unutarnjem dijelu diobenog vretena postoje i C- i S- oblici, dok u vanjskom dijelu vretena postoje uglavnom ravninski C-oblici.



Slika 39: Kutni pomak $\Delta\alpha$ za sustav s jednakim iznosima i okomitom orijentacijom momenata svijanja na lijevom i desnom kraju. a) Kutni pomak $\Delta\alpha$ za okomitu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom kraju, u ovisnosti o momentu torzije i momentu svijanja. b) Kutni pomak $\Delta\alpha$ za tri fiksna iznosa momenta svijanja. Za duljinu diobenog vretena je odabrana vrijednost $L = 10$ µm, a za modul svijanja vrijednost $\kappa = 900$ pNµm.

Uz paralelnu orijentaciju momenata svijanja u polovima (S-oblik), kao i njihovu antiparalelnu orijentaciju (C-oblik), promotrili smo kutni pomak za slučaj kada su ti momenti okomiti, slika 39, panel a), te daju asimetrični oblik. Slično kao i za C-oblik, asimetrični oblik je stabilan ako uvedemo torziju u sustav, tj. kod većih momenata svijanja teže je postići trodimenzionalni oblik. Na istoj slici, panel b), vidimo da je za moment torzije od 250 pNµm kutni pomak jednoznačno određen, $\Delta\alpha = 0.5\pi$, te ne ovisi o momentu svijanja.

Zaključak. Razvili smo minimalan teorijski model koji uključuje premosno vlakno koje povezuje dva sestrinska kinetohorna vlakna. Istražili smo parametarski prostor rješenja u dvije i tri dimenzije, pri čemu smo kod rješenja u tri dimenzije promotrili posebni slučaj gdje su točke spajanja infinitezimalno blizu, tj. može se zanemariti razlika između premosnog i kinetohornog vlakna. Klasificirali smo karakteristična oblike za rješenja u dvije i tri dimenzije,

te odredili fazne granice s obzirom na geometrijske karakteristike oblika i prirodu sila koja djeluje u smjeru spojnice polova. Pokazali smo da je moguće parametrizirati oblike u dvije dimenzije koristeći izmjerene konture sestrinskih kinetohornih vlakana u horizontalno položenim diobenim vretenima. O parametrizaciji modela za oblike u tri dimenzije bit će govora u odjeljku 4.2, s obzirom da, zbog velike varijabilnosti izmjerenih oblika snopova mikrotubula u unutrašnjem dijelu diobenog vretena, nije moguće izvršiti direktnu parametrizaciju kao za C-oblike u vanjskom dijelu diobenog vretena.

3 Teorijska predviđanja i usporedba s eksperimentom za vanjski dio diobenog vretena.

3.1 Vanjski dio diobenog vretena je konveksnog oblika i pod utjecajem sila kompresije

3.1.1 Ulazni i izlazni parametri modela

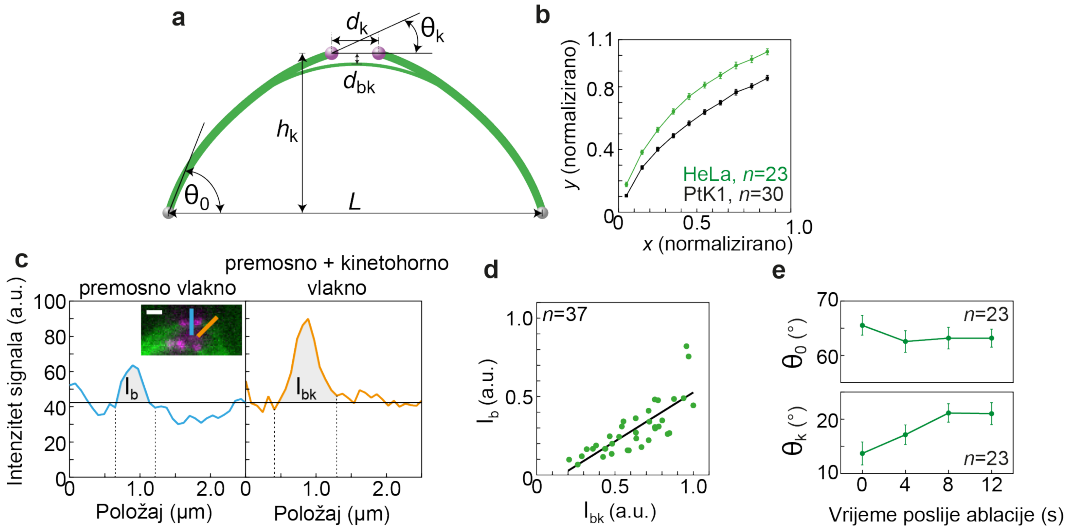
Do sada smo pokazali kako snop mikrotubula između kinetohora, koje smo nazvali premosni mikrotubuli, čini jedinstveni mehanički objekt sa pripadnim sestrinskim kinetohornim vlaknima. Motivirani tim otkrićem, razvili smo teorijski model koji uključuje sva tri vlakna. U našim eksperimentima smo opazili da su vanjski snopovi mikrotubula pretežno C-oblika, te smo stoga pojednostavnili naš model na ravninske i zrcalno simetrične oblike. Kako postoji direktna i jedan-na-jedan veza između sila i oblika koji nastaje uslijed tih sila, odlučili smo iz oblika saznati iznose sila koji djeluju u polu i na kinetohori, kao i skrivene detalje geometrije kao što je položaj točke spajanja.

Rekonstruirali smo konture snopova mikrotubula u horizontalno snimljenim diobenim vretenima kao skup točaka od pola do pola, slika 40. Taj skup točaka smo iskoristili da odredimo robusne geometrijske parametre: kut između kinetohornog vlakna i glavne osi diobenog vretena u polu θ_0, isti taj kut u blizini kinetohore θ_k, udaljenost između premosnog vlakna i kinetohore d_{bk}, udaljenost između sestrinskih kinetohora d_k, duljinu diobenog vretena L i polovicu njegove širine h_k, koji su prikazani u tablici 1. Utvrđeno je da se premosno vlakno nalazi tipično na unutrašnjoj strani kinetohornih vlakana, relativno prema središtu diobenog vretena, i to na udaljenosti od 0.24 ± 0.15 µm od kinetohora ($n = 42$ stanice). Nakon rezanja vanjskih kinetohornih vlakana, pronađeno je da se kut u polu značajno ne mijenja, dok se kut na kinetohori mjenja za $3.4 \pm 1.2^{\text{o}}$ u 4 s nakon rezanja. Taj podatak nam daje naslutiti da je kraj diobenog vretena učvršćen na određenom kutu, te ne može slobodno pivotirati, slika 40. Da bi model bio potpuno određen, još je potreban podatak o broju mikrotubula u premosnom vlaknu n_b. Taj podatak smo dobili iz relativnih intenziteta signala tubulina između premosnog vlakna i kinetohornog vlakna, poznavajući broj mikrotubula u kinetohornom vlaknu iz literature. Izmjeren je intenzitet signala tubulina između sestrinskih

Tablica 1: Popis ulaznih parametara za model snopova mikrotubula u dvije dimenzije, za vanjski dio diobenog vretena.

Broj mikrotubula u premosnom vlaknu, n_b	14 ± 2 $(n = 37)$
Kut između kinetohornog vlakna i glavne osi diobenog vretena u polu, $\theta_0\,(^\circ)$	65.5 ± 8.8 $(n = 23)$
Kut između kinetohornog vlakna i glavne osi diobenog vretena na kinetohori, $\theta_k\,(^\circ)$	13.7 ± 10.1 $(n = 23)$
Udaljenost između kinetohore i premosnog vlakna, $d_{bk}(\mu\mathrm{m})$	0.24 ± 0.15 $(n = 42)$
Udaljenost između sestrinskih kinetohora, $d_k(\mu\mathrm{m})$	1.05 ± 0.32 $(n = 52)$
Duljina diobenog vretena, $L(\mu m)$	11.1 ± 1.2 $(n = 52)$
Polovica širine diobenog vretena, $h_k(\mu\mathrm{m})$	5.0 ± 0.7 $(n = 52)$

kinetohora I_b, koji se može interpretirati kao signal premosnih mikrotubula, te intenzitet signala u blizini kinetohore I_{bk}, koji se može interpretirati kao signal kinetohornog i premosnog vlakna $I_b + I_k$, slika 40. Uočeno je da se zasebni signali I_b i I_k dosta mijenjaju od stanice do stanice, dok njihov odnos ostaje približno konstantan $I_b/I_{bk} = 45 \pm 2\%$ ($n = 37$ stanica, slika 40). Iz tog podatka smo dobili da premosno vlakno sadržava $I_b/I_k = (I_b/I_{bk})/(1 - I_b/I_{bk}) = 82 \pm 7\%$ broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu. Sličan omjer, $I_b/I_{bk} = 47 \pm 3\%$ je pronađen nakon laserskog rezanja, što potvrđuje našu hipotezu o međusobnoj povezanosti premosnog i kinetohornog vlakna. Također, u unutrašnjosti diobenog vretena je određen sličan omjer $I_b/I_{bk} = 46 \pm 1\%$, i to na pojedinim primjerima gdje je bilo moguće okom razlučiti kinetohorna vlakna od njihovih susjeda. Jednom kada je omjer I_b/I_{bk} poznat, može se upotrijebiti poznati podatak o broju mikrotubula u kinetohornom vlaknu $n_k = 17 \pm 2$, [78], [77], te na taj način dobivamo za broj mikrotubula u premosnom vlaknu $n_b = 14 \pm 2$. Valja napomenuti da se ovi brojevi odnose na HeLa stanice. Kod PtK1 stanica je izmjeren odnos intenziteta signala $I_b/I_{bk} = 20 \pm 2\%$ ($n = 30$ stanica). Kako je poznato da kinetohorna vlakna u PtK1 stanicama sadrže $n_k = 24 \pm 5$ mikrotubula, [45], iz ovog podatka proizlazi da premosna vlakna u PtK1 stanicama sadrže $n_b = 6 \pm 1$ mikrotubula. To mjerenje je u skladu sa dosadašnjim mjerenjima baziranim na elektronskoj tomografiji, [79] .



Slika 40: Parametrizacija modela pomoću geometrijskih karakteristika vanjskog snopa mikrotubula. a) Ulazni parametri modela b) Izmjerene srednje konture vanjskog snopa mikrotubula za dvije stanične linije c) Intenzitet tubulina u poprečnom presjeku između (I_b) i s jedne strane kinetohora (I_{bk}). d) Odnos inenziteta I_b i I_{bk}. e) Kut u polu θ_0 se ne mijenja nakon laserskog rezanja, relativno prema kutu na kinetohori θ_k, što upućuje na da je snop mikrotubula učvršćen u polu. Preuzeto iz [66].

Moduli svijanja premosnog vlakna i kinetohornih vlakana su određeni iz poznatog modula svijanja pojedinog mikrotubula i izmjerenog broja mikrotubula u tim vlaknima. Moduli svijanja se dobivaju iz izraza:

$$\kappa_{p,k,b} = n_{p,k,b}\kappa_0, \tag{3.1.1}$$

gdje je $n_{p,k,b}$ broj vlakana u štapovima p, k i b, te vrijedi $n_p = n_b + n_k$. U gornjem izrazu se koristi pretpostavka da se mikrotubuli u vlaknu mogu slobodno pomicati u odnosu jedan prema drugome kada se vlakno savija, što je motivirano otkrićem mreže konektorskih molekula koji povezuju mikrotubule u vlaknu, [14], za koju očekujemo da se preoblikuje sa svijanjem mikrotubula. Ako bi mikrotubuli bili čvrsto vezani u vlakna, tada bi se njihov elasticitet skalirao s n^2, što je pobliže objašnjeno u odjeljku 1.2.2.

Jednom kada su, uz elastičnost mikrotubula, utvrđeni geometrijski parametri , oni ulaze u model preko rubnih uvjeta i parametara modela. Već je rečeno da skup jednadžbi (2.2.9-

2.2.11), zajedno sa parametrima $F_0,\ F_k,\ M_0,\ \kappa_p,\ \kappa_k,\ \kappa_b,\ \theta_0,\ x_j,\ x_k,\ L/2$ i početnim uvjetima (2.2.15-2.2.20) daju jedinstveno rješenje, te samim tim i jedinstveni oblik premosnog vlakna i kinetohornih vlakana. Kako u ovom istraživanju nije bilo moguće izmjeriti četiri biološki relevantna parametra $F_0,\ F_k,\ M_0,\ x_j$, uvedena su geometrijska ograničenja na oblik. Na taj način su parametri $F_0,\ F_k,\ x_j$ postali izlazni parametri modela. Za parametar M_0 smo pretpostavili da iščezava, iz razloga što u našim eksperimentima nismo primijetili aktivnu rotaciju kinetohornog vlakna nakon laserskog rezanja. Razlog tome je taj što se izmjeren kut u polu nakon ablacije ne mijenja, te samim tim ne postoji generator momenta sile u polu. Prvo geometrijsko ograničenje je kut u polu, koji mora odgovarati eksperimentalno izmjerenom iznosu,

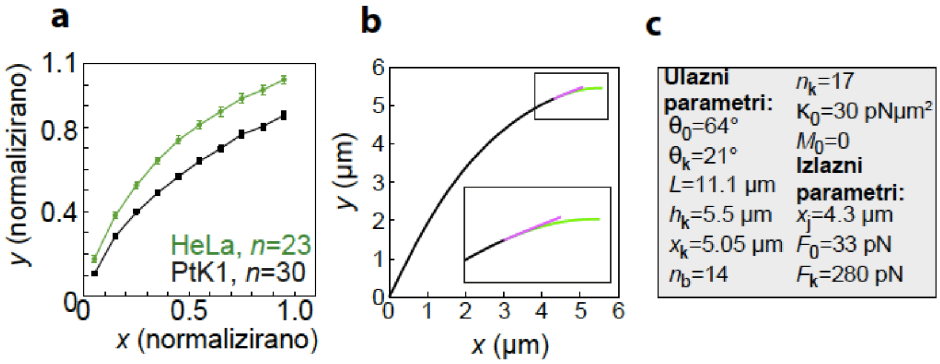
$$\left.\frac{dy_b}{dx}\right|_{x=0} = \tan\theta_0. \tag{3.1.2}$$

Drugo geometrijsko ograničenje je vertikalni položaj kraja drugog štapa h_k, koji mora odgovarati eksperimentalno izmjerenom iznosu vertikalnog položaja kinetohore,

$$y_k|_{x=x_k} = h_k. \tag{3.1.3}$$

Treće geometrijsko ograničenje je kut na kinetohori, koji mora odgovarati eksperimentalno izmjerenom iznosu,

$$\left.\frac{dy_k}{dx}\right|_{x=x_k} = \tan\theta_k. \tag{3.1.4}$$



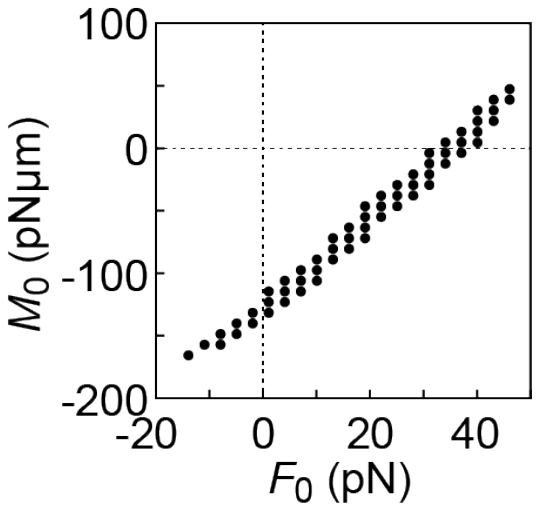
Slika 41: Teorijska reprodukcija eksperimentalno izmjerenog srednjeg oblika vanjskog snopa mikrotubula. a) Eksperimentalno izmjereni srednji oblik vanjskog snopa mikrotubula za HeLa i PtK1 stanice, b) Teorijsko reprodukcija za oblik vanjskog snopa mikrotubula za HeLa stanice, c) Parametri modela koji odgovaraju teorijskom predviđanju. Preuzeto iz [66].

Iz parametriziranog ravninskog modela smo dobili kao prvi podatak oblik vanjskog para sestrinskih kinetohornih vlakana i premosnog vlakna. Na slici 41 je prokazano kako teorijski dobiven oblik dobro odgovara eksperimentalno izmjerenom i usrednjenom obliku, prisutnom u HeLa stanicama. Oblik smo izračunali tako da smo numerički izračunali jednadžbe (2.2.9-2.2.11) s rubnim uvjetima (2.2.15-2.2.20) i (3.1.2-3.1.4), uz variranje parametara $F_0,\ F_k,\ x_j$, pri čemu su parametri $\kappa_p,\ \kappa_k,\ \kappa_b,\ \theta_0,\ x_k,\ L/2$ bili zadani i fiksirani, te nametnut uvjet zrcalne simetrije. Trojka parametara $F_0,\ F_k,\ x_j$ koja odgovara eksperimentalno izmjerenim vrijednostima oblika predstavlja izlazni parametar i predviđanje modela.

Model predviđa silu kompresije u polu diobenog vretena $F_0 = 33$ pN, koja djeluje u smjeru prema metafaznoj ravnini. Model također predviđa silu tenzije na kinetohori $F_k = 280$ pN, koja se prenosi duž kinetohornog vlakna između točke spajanja i kinetohore. Točka spajanja se nalazi na horizontalnom položaju $x_j = 4.45$ μm, veoma blizu kinetohori. Dvije sile, sila na kinetohori i sila u poli, koje djeluju prema sredini diobenog vretena, su uravnotežene silom kompresije u središnjem dijelu premosnog vlakna između dvije točke spajanja.

3.1.2 Komplementarnost sila i momenata sila u polovima

U prijašnjem odjeljku je navedeno kako za M_0 pretpostavljamo da iščezava. Pretražen je parametarski prostor rješenja koja odgovaraju eksperimentalno izmjerenoj geometriji, te je utvrđeno da se M_0 i F_0 ponašaju kao komplementarne veličine. Što je veći moment sile u polu, to je potrebna manja sila u polu i obrnuto, što se vidi i na slici 42. Parametarski prostor je ograničen na način da je kut u polu ograničen na interval $\theta_0 = 56.7\text{-}74.3^{\text{o}}$, kut na kinetohori na interval $\theta_k = 3.6\text{-}23.8^{\text{o}}$, vertikalni položaj kinetohore na interval $h_k = 4.3\ \mu\text{m} - 5.7\ \mu\text{m}$. Duljina diobenog vretena i horizontalni položaj kinetohore su zadani sa $L = 11.1\ \mu\text{m}$ i $x_k = 5.05\ \mu\text{m}$. Broj mikrotubula u premosnom vlaknu je $n_b = 14$ i broj mikrotubula u kinetohornom vlaknu je $n_k = 17$. M_0 - F_0 dijagramu na slici 42 je dobiven diskretizacijom sile i momenta sile u polu u koracima od $\Delta F_0 = 3$ pN i $\Delta M_0 = 5$ pNμm.



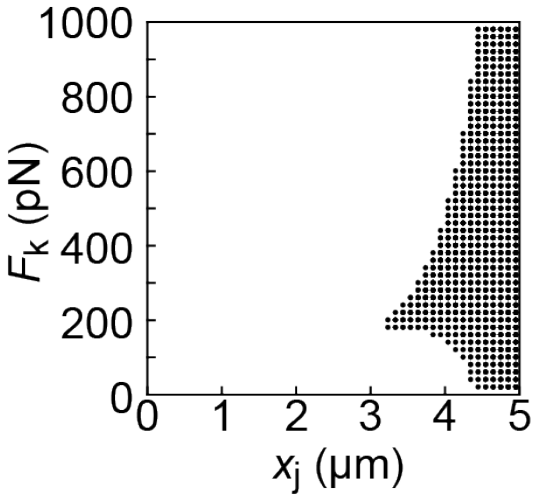
Slika 42: Komplementarnost sila i momenata sila u vanjskom snopu mikrotubula, u diobenom vretenu. Sila u polu može nadomjestiti moment sile u polu. Preuzeto iz [66]

Svaka točka u tom dijagramu ima nekoliko mogućih vrijednosti F_k i x_j, koje nisu prikazane. Sila na kinetohori je diskretizirana na četiri moguće vrijednosti 80 pN, 160 pN, 240 pN i 320 pN. Jednadžbe (2.2.9 - 2.2.11) su riješene numerički „midpoint" i Runge-Kutta (4ti red) metodom. Pokazuje se da je „midpoint" metoda numerički nestabilna za $M_0 > 100$ pNμm, tj. konvergira tek za broj točaka $n = 500$. Utjecaj relativnog udjela M_0 i F_0 na oblik rješenja

je taj da oblici s većim udjelom M_0 imaju nešto veću zakrivljenost u blizini polova i stoga manju vrijednost parametra h_k .

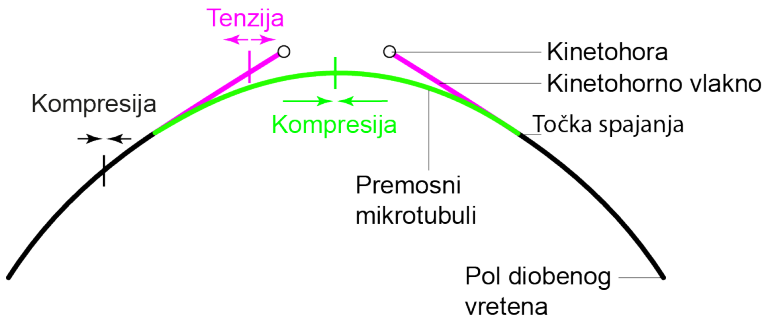
3.1.3 Dozvoljeno područje parametarskog prostora

Kako bismo utvrdili koje područje parametarskog prostora najbolje opisuje eksperimentalno izmjereni i usrednjeni oblik vanjskog dijela diobenog vretena, varirali smo parametre $F_0,\ F_k,\ x_j$, pri čemu su parametri $\kappa_p,\ \kappa_k,\ \kappa_b,\ \theta_0,\ x_k,\ L/2$ bili zadani, te je nametnut uvjet zrcalne simetrije. Oblici vanjskog dijela diobenog vretena su izračunati za veličinu koraka od $\Delta x = (x_f - x_i)/50$, gdje su x_i i x_f krajnje točke intervala koji se odnose na jednadžbe (2.2.9-2.2.11). Parovi parametara F_k i x_j koji odgovaraju eksperimentalno izmjerenim vrijednostima h_k i θ_k unutar standardne devijacije srednje vrijednosti predstavljaju dozvoljene vrijednosti parametarskog prostora. Svaki par parametara F_k i x_j jednoznačno određuje silu u polu F_0. Slika 43 je dobivena diskretizacijom sile na kinetohori u koracima $\Delta F_k = 20$ pN, diskretizacijom položaja točke spajanja u koracima od $\Delta x_j = 0.1$ µm, te diskretizacijom sile u polu unutar intervala $F_0 = 30-40$ pN, i to u 10 koraka. Gornja granica dozvoljenog područja parametarskog prostora je određena sa izvijanjem premosnih mikrotubula, tj. njihovim pomakom prema vanjskoj strani kinetohora u odnosu na centar diobenog vretena, što nije nikada viđeno u neperturbiranim stanicama. Donja granica dozvoljenog područja je određena donjom granicom kuta na kinetohori. Na slici 43 se primjećuje kako je zadana geometrija robusna na veliku promjenu sila na kinetohori, uz uvjet da je položaj točke spajanja vrlo blizu kinetohori. Kako je izgledno da je u stanici prisutan raspon sila na kinetohori kao i raspon položaja točke spajanja, model predviđa silu na kinetohori u rasponu $F_k \approx 100 - 300$ pN i položaj točke spajanja u rasponu $x_j \approx 3 - 5$ µm.



Slika 43: Dozvoljeno područje parametarskog prostora za parametre x_j i F_k. Gornja granica je određena pojavom izvijanja u premosnom vlaknu, a donja minimalnim dozvoljenim kutom na kinetohori. Preuzeto iz [66].

Zaključak. Sile koje djeluju na diobeno vretenu su ključne za pozicioniranje kromosoma u metafaznu ravninu tijekom metafaze. Poznavanje sila u metafazi daje ujedno i vrijednu informaciju o uvjetima za početak anafaze, s obzirom da se smatra da je tenzija jedan od važnih čimbenika koji to određuje, [21]. Iako te sile nismo direktno izmjerili, naš model nam je omogućio da ih odredimo iz eksperimentalno izmjerenog oblika vanjskog dijela diobenog vretena. Odredili smo da su sile tenzije na kinetohori oko nekoliko stotina pN. Ta vrijednost je značajno manja nego maksimalna sila od 700 pN izmjerena na kromosomima u anafazi [80], ali veća od 50 pN, što je ocijenjeno iz mjerenja istegnuća kromosoma u prometafazi, [70]. U našem modelu, sile tenzije na kinetohori su uravnotežene sa silama kompresije u premosnom vlaknu, tj. naš model objašnjava koegzistenciju sila kompresije i tenzije u paru kinetohornih vlakana. Točnije, dio kinetohornog vlakna između točke spajanja i kinetohore je pod silama tenzije, dok je zajednički snop mikrotubula koji se sastoji od kinetohornog i premosnog vlakna, kao i središnji dio premosnog vlakna, pod silama kompresije. Na taj način je riješen paradoks ravnoteže sila izložen u odjeljku 1.1.3 i predložena nova mapa sila u vanjskom dijelu diobenog vretena, prikazana na slici 44.



Slika 44: Koegzistencija sila tenzije i sila kompresije u diobenom vretenu. Prilagođeno iz [66].

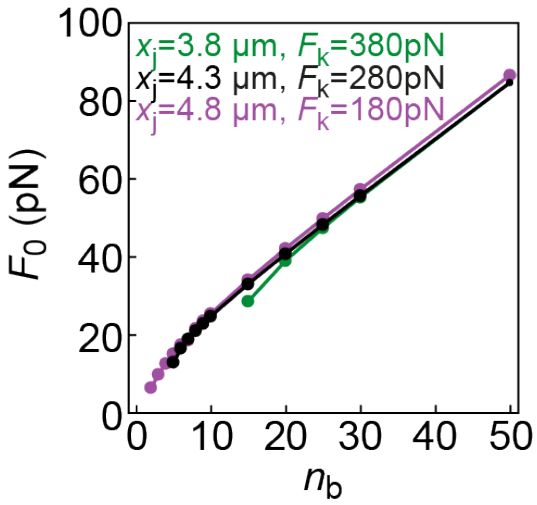
3.2 Sila u polu je veća ako je premosno vlakno deblje

3.2.1 Teorijsko predviđanje

Debljina premosnog vlakna, točnije njegov modul svijanja κ_b, je jedan od parametara u modelu koji snažno utječe na izlazne parametre modela $F_0,\ F_k,\ x_j$. Intuitivno je pretpostaviti da je potrebna veća sila u polu za veći modul svijanja, tj. teže je saviti deblji snop mikrotubula. S druge strane, ako prerežemo snop mikrotubula na koji djeluje veća sila u polu, F_0, njegovo izravnavanje će biti brže. Razlog tome je proporcionalnost sile i brzine u mediju velike viskoznosti kao što je nukleoplazma koja okružuje diobeno vreteno. Stoga je teorijski istražen utjecaj debljine premosnog vlakna na silu F_0 , te eksperimentalno izmjeren odgovor vanjskih parova kinetohornih vlakana na lasersko rezanje, i to za tri stanične linije koje se razlikuju u debljini premosnog vlakna.

Iz našeg modela smo odredili koliko je debljina premosnog vlakna važna za ravnotežu sila u vanjskom dijelu diobenog vretena. Riješili smo model za različite debljine premosnog vlakna, te utvrdili da deblje premosno vlakno, s više premosnih mikrotubula, odgovara većoj sili u polu, što je u skladu s našom intuitivnom pretpostavkom. Pokazali smo da je taj rezultat slabo osjetljiv o sili na kinetohori i o položaju točke spajanja, te smo na slici 45 uz središnju liniju koja odgovara vrijednostima iz slike 41 prikazali ekstremne vrijednosti koje ulaze u dozvoljeno područje na slici 43. Ovisnost na slici 45 smo izračunali tako da smo zadali početni kut θ_0 , silu na kinetohori F_k i položaj točke spajanja x_k, te izračunali silu u polu F_0

za koju je zadovoljen uvjet zrcalne simetrije. Kut na kinetohori θ_k pri tome ostaje slobodan. Kada smo računali $n_b - F_0$ ovisnost za par ulaznih parametara $x_j = 3.8$ µm, $F_k = 380$ pN, dobili smo kontinuum konkavnih oblika za konačni raspon F_0 za $n_b < 15$, te te točke nisu prikazane.

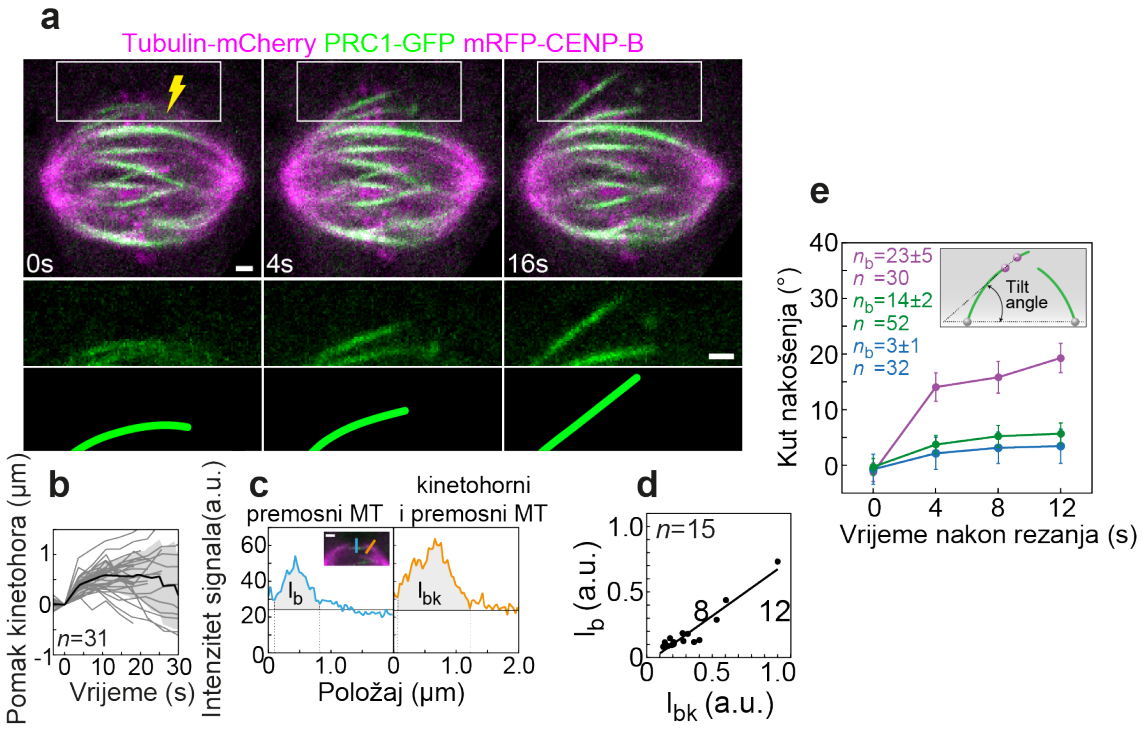


Slika 45: Sila u polu raste sa povećanjem broja mikrotubula u premosnom vlaknu, neovisno o sili na kinetohori i položaju točke spajanja. Preuzeto iz [66].

3.2.2 Eksperimentalna provjera

Naš model predviđa da je sila u polu veća za deblje premosno vlakno. To predviđanje smo eksperimentalno testirali laserskim rezanjem vanjskog para kinetohornih vlakana i premosnog vlakna, i to za tri stanične linije koje se razlikuju u debljini premosnog vlakna. Pretpostavili smo se da je odgovor odsječka kinetohornog i premosnog vlakna nakon rezanja brži ako je sila u polu veća. To pretpostavljamo zbog toga što relaksacija sile u polu generira izravnavanje premosnog vlakna nakon rezanja. Brzinu izravnavanja kinetohornih i premosnog vlakna je eksperimentalno kvantificirana mjerenjem kuta nakošenja para kinetohora u odnosu na glavnu os diobenog vretena, slika 46. U diobenom vretenu prije laserskog rezanja, kut nakošenja kinetohora je veoma blizu nuli, te se on nakon rezanja povećava. Razlog odabiru takve kvantizacije je lakše određivanje položaja kinetohora u odnosu na položaje mikrotubula. Broj mikrotubula u premosnom vlaknu je određen iz relativnog signala tubulina za premosno i

kinetohorno vlakno, pri čemu je i dalje zadržana vrijednost broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu $n_b = 17$.

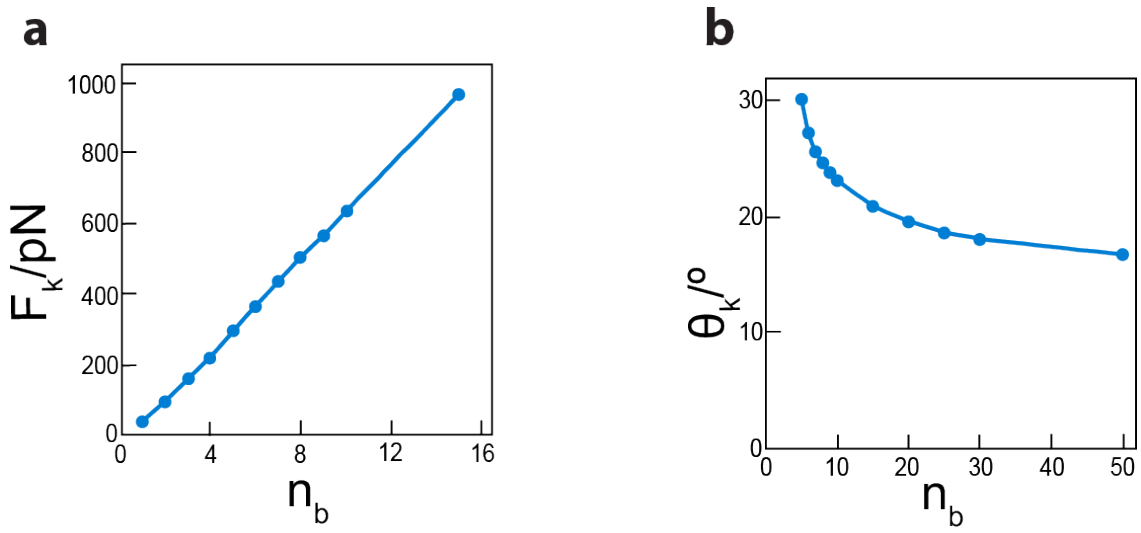


Slika 46: Stanična linija s debljim premosnim vlaknom ima veći odgovor na lasersko rezanje. a) Vremenski isječci ablacije diobenog vretena HeLa stanica s debljim premosnim vlaknom, sa obilježenim tubulinom, kinetohorama i vezivnim proteinom PRC1. b) Pomak kinetohore bliže mjestu laserskog rezanja, u ovisnosti o vremenu nakon laserskog rezanja, u smjeru okomitom na glavnu os diobenog vretena. Pomak je izračunat u odnosu na položaj kinetohore prije laserskog rezanja. Analizirane su HeLa stanice s obilježenim tubulinom, kinetohorama i vezivnim proteinom PRC1. c i d) Međusobni odnos intenziteta premosnog vlakna i premosnog vlakna zajedno sa kinetohornim vlaknom. e) Kut nakošenja u ovisnosti o vremenu nakon ablacije za tri linije HeLa stanica: sa tankim, neperturbiranim i debelim premosnim vlaknom. Preuzeto iz [66].

U neperturbiranoj staničnoj liniji, gdje je broj mikrotubula u premosnom vlaknu $n_b = 14 \pm 2$, sestrinske kinetohore su 4 s nakon rezanja poprimile kut nakošenja od $4.0 \pm 0.7^{\circ}$, iz čega se vidi da se odsječak izravnao iz početnog zakrivljenog oblika. Stanična linija sa debljim premosnim vlaknom, koja je genetski modificirana da proizvodi više obilježenog proteina PRC1 i obilježenog tubulina, ima deblje premosno vlakno gdje je $n_b = 23 \pm 5$. U tim

stanicama sestrinske kinetohore su se nakosile nakon 4 s za kut od 15.9 ± 2.1^{o}, što znači da se u tim stanicama odsječak nakon rezanja izravnava brže. Proizvedena je i stanična linija s tanjim premosnim vlaknom, gdje je $n_b = 3 \pm 1$, koje su genetski modificirane tako da proizvode manje PRC1 proteina. Sestrinske kinetohore su se nakon rezanja nakosile za kut od 2.9 ± 1.0^{o}, što je nešto manje nego kod neperturbirane stanične linije, što znači da se odsječak izravnava sporije. Na taj način smo eksperimentalno potvrdili da sila u polu diobenog vretena raste s debljinom premosnog vlakna.

Ovisnost sile i kuta na kinetohori o debljini premosnog vlakna Zanima nas također kakav je utjecaj debljine premosnog vlakna na silu na kinetohori. Stoga smo izračunali maksimalnu silu na kinetohori za koju oblik doseže granicu izvijanja, uz zadanu točku spajanja i zadani kut u polu, slika 47. Može se vidjeti da teorija predviđa veću maksimalnu silu na kinetohori, F_k, za stanice s debljim premosnim vlaknom. Taj rezultat je intuitivan, s obzirom da premosno vlakno uravnotežuje silu tenzije na kinetohori, te je deblje premosno vlakno teže saviti u konkavni oblik. Također je izračunat kut na kinetohori u ovisnosti o debljini premosnog vlakna, uz zadani položaj točke spajanja, silu na kinetohori i kut u polu 47. Dobiveno je da se kut na kinetohori smanjuje s debljinom premosnog vlakna, tj. diobeno vreteno postaje okruglije.



Slika 47: Utjecaj debljine premosnog vlakna na karakteristike diobenog vretena. a) Ovisnost maksimalne sile na kinetohori (do pojave izvijanja) o broju mikrotubula u premosnom vlaknu. b) Ovisnost kuta na kinetohori o broju mikrotubula u premosnom vlaknu.

Zaključak. Iz izmjerenog kuta nakošenja kinetohora, zaključili smo da sila u polu raste s debljinom premosnog vlakna. Poznato je da diobena vretena, ovisno o vrsti stanice, imaju raznovrsne oblike. Teorija također predviđa da su diobena vretena sa debljim premosnim vlaknom okruglog oblika, dok su diobena vretena sa tanjim premosnim vlaknom dijamantnog oblika, uz uvjet da ostali geometrijski parametri, te sila na kinetohori, F_k, ostaju nepromijenjeni. To predviđanje je potvrđeno usporedbom oblika ljudskih HeLa i životinjskih PtK1 stanica, gdje je debljina premosnog vlakna u PtK1 stanicama značajno manja od debljine premosnog vlakna u HeLa stanicama. Iako teorija predviđa da deblji premosni mikrotubuli mogu uravnotežiti veću silu na kinetohori, tako da uz promjenu oblika možemo očekivati i razliku u sili tenzije na kinetohorama, ipak smatramo da je oblik direktna posljedica debljine premosnog vlakna. Naime, dobri kandidati za generiranje sile tenzije na kinetohorama su molekularni motori na kinetohori. Pretpostavljamo da njihovo djelovanje i koncentracija ne ovise o debljini premosnog vlakna, te zbog tog razloga spekuliramo da se oblik, a ne tenzija na kinetohori, mijenja s debljinom premosnog vlakna.

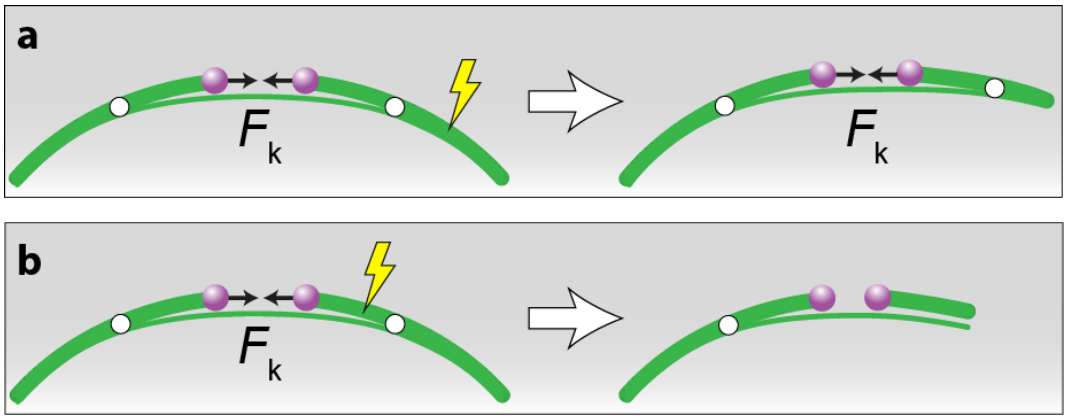
3.3 Premosno vlakno uravnotežuje tenziju na kinetohorama

3.3.1 Teorijsko predviđanje

U našem modelu je oblik štapa b, koji predstavlja središnji dio premosnog vlakna, posljedica ukupnog djelovanja sile na kinetohori i sile u polu, s obzirom da mora vrijediti ravnoteža sila u točki spajanja. Stoga model predviđa da je postojanje premosnog vlakna nužno za uravnoteženje sile tenzije na kinetohorama. Stoga je dizajniran eksperiment u kojem je selektivno rezano premosno vlakno, kako bismo vidjeli pomak u ravnoteži sila u vanjskom dijelu diobenog vretena.

Naš model predviđa dva moguća scenarija za relativni pomak kinetohora nakon laserskog rezanja, ovisno o tome da li je kinetohorno vlakno prerezano između točke spajanja i pola ili točke spajanja i kinetohore, slika 48. U prvom slučaju će ostati sačuvana veza premosnog i kinetohornog vlakna, te će premosno vlakno nastaviti uravnoteživati silu tenzije između kinetohora i nakon rezanja. U drugom slučaju je veza između premosnog i kinetohornog

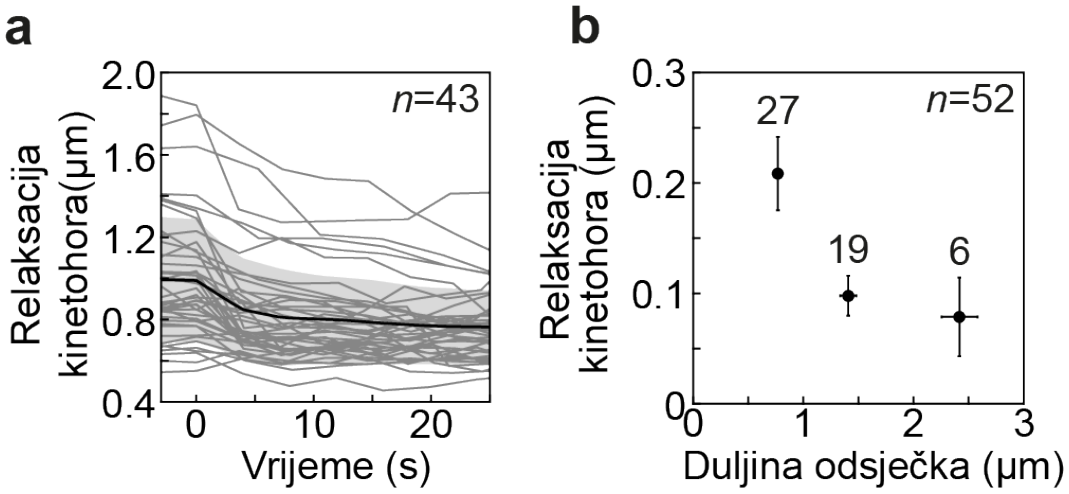
vlakna prekinuta te se kinetohore približuju jedna drugoj u smjeru sile tenzije, tj. relaksiraju. U tom drugom slučaju nema više sile tenzije na kinetohorama, jer je nema što uravnotežiti.



Slika 48: Dva moguća ishoda nakon laserskog rezanja vanjskog dijela diobenog vretena. a) Rezanje snopa mikrotubula između točke spajanja i pola. b) Rezanje snopa mikrotubula između točke spajanja i kinetohore. Preuzeto iz [66].

3.3.2 Eksperimentalna provjera.

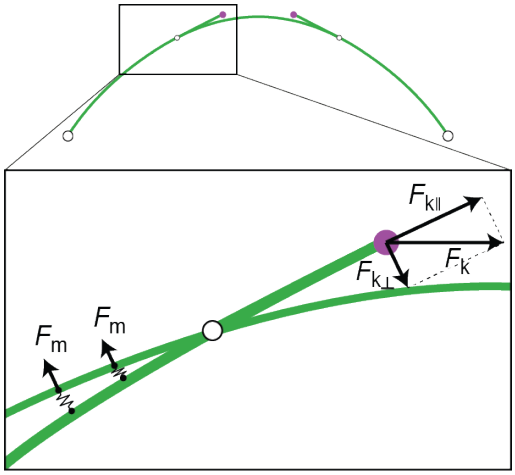
Kako bi se istražilo predviđanje modela o tenziji na kinetohorama u ovisnosti o položaju rezanja, proveden je niz eksperimenata s laserskim rezanjem. U tim eksperimentima je mjerena udaljenost između kinetohora koja je korištena kao pokazatelj sile tenzije. Bez obzira na to gdje je rez izvršen, sestrinske kinetohore su se približile jedna ka drugoj, slika 49. No također je izmjerena veća relaksacija (približavanje) kinetohora za rezove koji su bliže kinetohori, što ukazuje na gubitak sile tenzije na kinetohori, kao što i naš model predviđa. Pomak kinetohora je mjeren 4 s nakon rezanja. Uočeno je da pomak preostalog odsječka kinetohornog i premosnog vlakna prema polu započinje tek nakon 15 s, te je na taj način vremenski odvojen efekt pomicanja odsječka prema polu i same relaksacije kinetohora. Prijelaz iz velikih prema manjim relaksacijama kinetohora je uočen kada je kinetohorno vlakno bilo rezano na vrijednosti $x_j \sim 1$ µm od kinetohore, što je neovisna potvrda predviđanja našeg modela o položaju točke spajanja, slika 49.



Slika 49: Nakon laserskog rezanja vanjskog dijela diobenog vretena, kinetohore se relaksiraju. a) Relativni pomak kinetohora jedne prema drugoj (relaksacija) u ovisnosti o vremenu nakon ablacije. b) Relaksacija kinetohora u ovisnosti o mjestu rezanja duž konture vanjskog snopa mikrotubula. Preuzeto iz [66].

Zaključak. Izmjerena ovisnost relaksacije kinetohore o položaju laserskog reza duž konture kinetohornog vlakna potvrđuje našu hipotezu o organizaciji vanjskog dijela diobenog vretena. Također smo kvantitativno potvrdili položaj točke spajanja. Postavlja se pitanje o detaljnoj građi točke spajanja. U našem model točka spajanja je predstavljena kao idealna matematička točka gdje se glatko i kontinuirano spajaju premosno i kinetohorno vlakno. Ta pretpostavka odgovara opažanju naših suradnika, gdje je uočeno da jedan podskup EB3 kometa putuje duž kinetohornog vlakna prema kinetohori, dok drugi podskup putuje u prostor ispod i između kinetohora. Naš model ne uključuje vezivne proteine i sile koje oni proizvode, a koji su vjerojatno važni za detaljnu građu točke spajanja. Kako tenzija vuče cijelo kinetohorno vlakno prema metafaznoj ravnini, očekuje se da postoji sila na kinetohorno vlakno koje uravnotežuje to naprezanje. Tu silu mogu stvoriti vezivni proteini na koje djeluje sila tenzije, i to upravo u području točke spajanja. Ravnoteža sila na kinetohorno vlakno je uspostavljena ako je kinetohorno vlakno ispod premosnog vlakna u području gdje postoje vezivni proteini. U tom istom području očekuje se da se premosno i kinetohorno vlakno presijeku, slika 50. Očekujemo također da se vezivni proteini nalaze duž čitavog područja dodira između premosnog vlakna i kinetohornog vlakna, a ne samo u području presjeka. Poznato je da se u metafazi kinetohore oscilatorno gibaju oko metafazne ravnine, [20], kao i to da se

kinetohorna vlakna produžuju i skraćuju. Mikroskopski opis točke spajanja koji predlažemo može objasniti dinamičku promjenu točke spajanja, te na taj način dozvoljava postojanje gore spomenutog oscilatornog gibanja kinetohora.



Slika 50: Hipoteza o mikroskopskoj strukturi točke spajanja. Preuzeto iz [66].

3.4 Zaključak

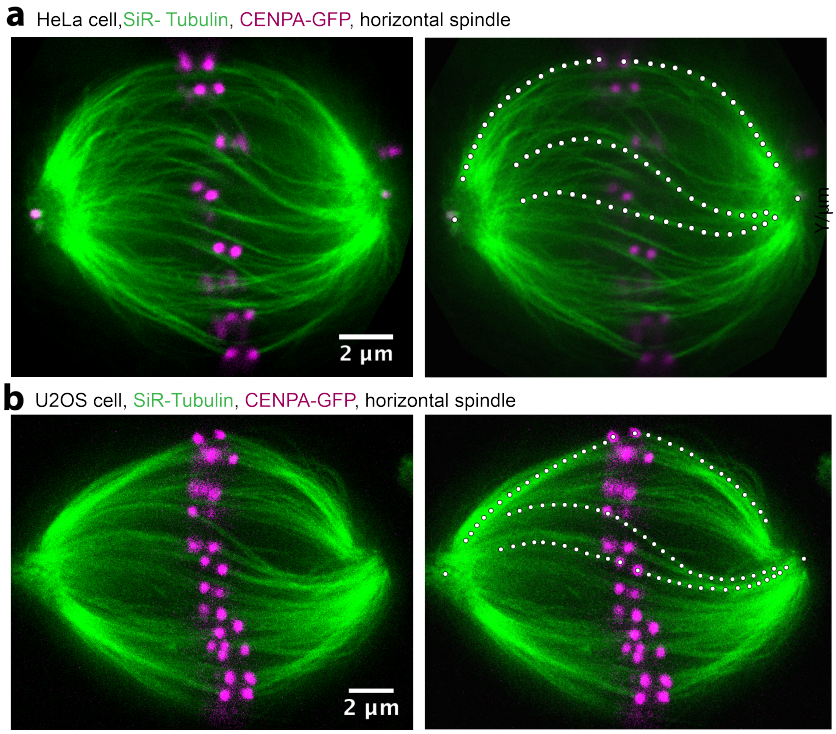
Provjerili smo dva predviđanja našeg modela pomoću eksperimentalne perturbacije tipičnih diobenih vretena u ljudskim stanicama. Model predviđa da na diobeno vreteno s debljim premosnim vlaknom djeluje veća sila u polu kako bi nastala ista ili približna geometrija kao za tipično diobeno vreteno. U našim eksperimentima smo to potvrdili mjerenjem odgovora na ablaciju za tri različite debljine premosnog vlakna. Kako brzina, tj. ukupni prijeđeni kut, približno linearno ovisi o sili koja uzrokuje odgovor odsječka nakon laserske ablacije, u granici jakog gušenja, očekujemo veći odgovor za staničnu liniju s debljim premosnim vlaknom, što je i potvrđeno. Model također predviđa da prekid veze između premosnog i kinetohornog vlakna dovodi do gubitka sile tenzije na kinetohori. Taj scenarij se može ostvariti rezanjem kinetohornog vlakna između točke spajanja i kinetohore. U našim eksperimentima smo to potvrdili rezanjem vanjske konture diobenog vretena u različitim točkama. Također je neovisno izmjeren položaj točke spajanja na vrijednosti x_j ∼1 µm od kinetohore, kako je dobiveno iz parametrizacije modela izložene u odjeljku 3.1.1.

4 Proučavanje unutarnjeg dijela diobenog vretena

4.1 Snopovi mikrotubula u diobenom vretenu su kiralni u HeLA i U2OS stanicama

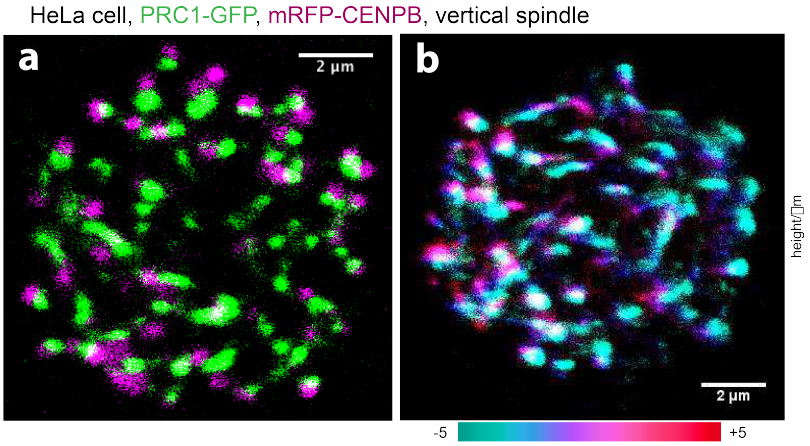
U odjeljku 3.1 smo razmatrali kako oblici snopova mikrotubula u vanjskom dijelu diobenog vretena indirektno daju informaciju o silama prisutnim u diobenom vretenu. No, uz vanjski dio diobenog vretena, za potpuno razumijevanje ravnoteže sila u metafazi nužno je proučiti i unutarnji dio diobenog vretena. Da bi se sistematski odredili oblici unutarnjih snopova mikrotubula, poželjno je koristiti metode snimanja fiksiranih stanica u višoj rezoluciji u odnosu na fluorescencijsku mikroskopiju. Razlog tome su značajna preklapanja signala tubulina u blizini polova između različitih snopova. Iz tog razloga smo koristili STED super-rezolucijsku mikroskopiju za snimanje ljudskih HeLa i U2OS stanica, [81], uz koju je moguće postići rezoluciju i do 50 nm. Razlog tome je što rezolucija STED mikroskopije nije ograničena difrakcijom kao kod svjetlosne mikroskopije. STED snimke živih ljudskih stanica pokazuju da se snopovi mikrotubula pružaju kontinuirano od pola do pola, te da poprimaju raznovrsne oblike.

Iz STED snimki potvrđeno je da snopovi mikrotubula u vanjskom dijelu diobenog vretena imaju C-oblik, dok unutarnji snopovi mikrotubula imaju asimetričan ili, znatno rjeđe, antisimetričan S-oblik, slika 51.



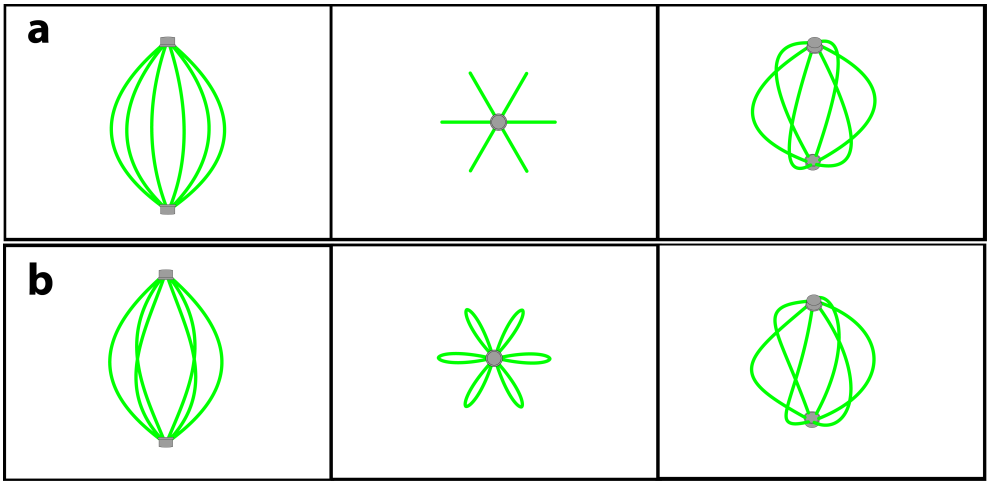
Slika 51: STED snimka HeLa i U2OS stanica sa obilježenim tubulinom, prikazanim zelenom bojom. a) HeLa stanice. b) U2OS stanice. Može se uočiti pojava raznovrsnih oblika, kao što su simetrični C-oblik, antisimetrični i asimetrični S-oblik.

Iako su ti oblici međusobno različiti, postavlja se pitanje dijele li oni zajedničko podrijetlo, s obzirom da pretpostavljamo zajedničke sile i momenti sila koji djeluju na njih u točkama gdje su prisutni motori, dinamički krajevi mikrotubula ili drugi stanični objekti kao što su centrosomi. Postojanje takve raznovrsnosti i bogatstva oblika, navelo nas je na pitanje da li su oni projekcije trodimenzionalnih oblika. Iz tog razloga su snimljena i analizirana vertikalno položena diobena vretena. Takav položaj vertikalnih vretena je odabran selekcijom između raspoloživih stanica u polju snimanja, a nalazi se u malom broju slučajeva u staničnoj kulturi. U jednoj ravnini snimanja vertikalno položene stanice signal snopova mikrotubula izgleda kao skup diskova intenziteta. Praćenjem centara tih tiskova, tj. praćenjem snopova mikrotubula duž konture, utvrdili smo da su snopovi mikrotubula u metafazi trodimenzionalni, a ne ravninski objekti, slika 52.



Slika 52: Snimka vertikalno položenog diobenog vretena HeLa stanice s obilježenim proteinom PRC1. a) Projekcija od deset ravnina oko središnje metafazne ravnine. b) Projekcija s gradijentom obojanja od deset ravnina (TCC) oko središnje metafazne ravnine. Možemo vidjeti da se diskovi intenziteta pomiču s lijeva (plavo) na desno (ljubičasto), tijekom pomicanja ravnine snimanja od stakalca prema vrhu diobenog vretena.

Kada bi bilo suprotno, maksimalna projekcija ravnina s gradijentom obojanja (TCC, Temporal Color Code) bi prikazivala ravne linije koje se protežu od centra do periferije, slika 53. Također smo utvrdili da su snopovi mikrotubula kiralni, tj. da preferiraju lijevu rotaciju signala intenziteta kada se ravnina snimanja pomiče od stakalca prema vrhu diobenog vretena.



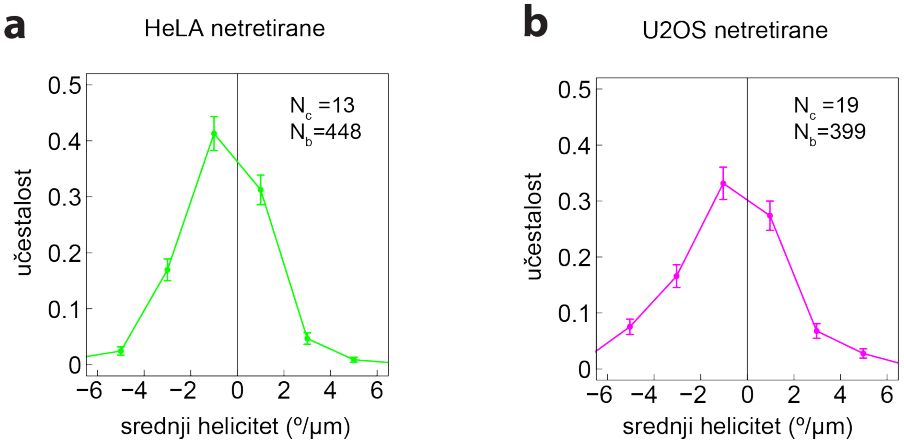
Slika 53: Prikaz modela diobenog vretena (bokocrt, tlocrt i trodimenzionalni prikaz) kod a) odsustva momenta torzije u sustavu i kod b) postojanja momenta torzije u sustavu.

Do sada je pokazano je da postoji kiralnost u živim stanicama koja potječe od djelovanja

aktomiozinskog citoskeleta i njegove samo-organizacije u kiralne strukture, [85]. Uslijed tog djelovanja dolazi do asimetričnog položaja staničnih organela, [86]. Također, u staničnoj diobi tijekom embriogeneze, asimetričan položaj diobenog vretena uslijed gore navedenog svojstva kiralnosti, dovodi do kiralne asimetrije u položaju novonastalog tkiva, [86]. S druge strane, pokazano je da u *in vitro* mikrotubuli mogu rotirati u smjeru suprotnom od kazaljke na satu kada se kreću po podlozi obloženoj molekularnim motorima Eg5, tj. kinezinom-5 u ljudskim stanicama, i to s korakom od 2.3 µm [82]. Te činjenice otvaraju zanimljivu mogućnost kiralne samo-organizacije u diobenom vretenu. Stoga smo rekonstruirali konture snopova mikrotubula snimljene u vertikalno položenim diobenim vretenima, te smo uveli mjeru heliciteta kako bi opisali kiralnost pojedinih snopova mikrotubula. Helicitet definiramo kao:

$$H(x) = \int_{L/4}^{3L/4} \frac{d\phi(x)}{dx}, \tag{4.1.1}$$

gdje je $\phi(x)$ kut između komponente radijalnog vektora $y(x)\hat{\mathbf{y}} + z(x)\hat{\mathbf{z}}$ i proizvoljne ravnine koja sadržava x-os. Oblici koji imaju mali helicitet sličniji su ravninskim C-oblicima, dok su oblici koji imaju veliki helicitet sličniji ravninskim S-oblicima. Na slici 54 prikazani su histogrami heliciteta za skup snopova mikrotubula od $n = 448$ za HeLa stanice i $n = 399$ za U2OS stanice. Može se vidjeti da je srednji helicitet negativan u oba slučaja, te da obje stanične linije imaju lijevu kiralnost.

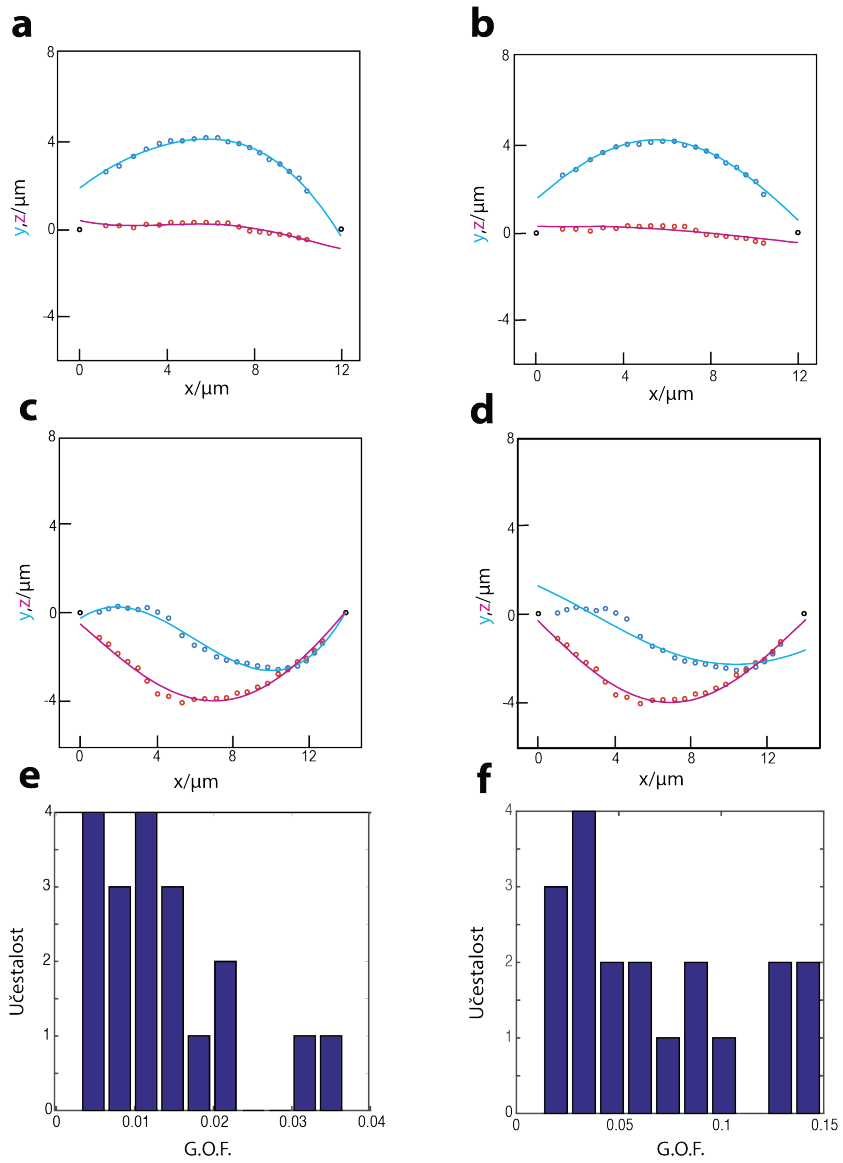


Slika 54: Histogrami heliciteta za netretirane (neperturbirane) HeLa i U2OS stanice. N_c je broj analiziranih stanica u uzorku, a N_b broj analiziranih snopova mikrotubula u uzorku.

Sličnost rezultata za HeLa i U2OS stanice upućuje na činjenicu da je svojstvo kiralnosti karakteristično za snopove mikrotubula u diobenom vretenu te nije rezultat fluorescentnog obilježavanja proteina i fiksacije.

4.2 Momenti sila objašnjavaju kiralnost diobenog vretena

Usporedili smo konturu svakog pojedinog snopa sa općenitim modelom u tri dimenzije, zadanim statičnom Kirchoffovom jednadžbom (2.2.1), i to u aproksimaciji malih kutova. Parametri prilagodbe u modelu su sile i momenti sila na lijevom polu, kao i položaj obje projekcije u lijevom i desnom polu, što ukupno čini deset parametara. Zanimljiv rezultat koji se nameće je da same sile u polovima, bez momenata sila, ne mogu opisati jednako uspješno cijeli skup izmjerenih oblika kao što to mogu momenti sila bez sile u smjeru spojnice polova. Primjer dva takva oblika, pri kojem se jedan oblik uspješno može opisati samo djelovanjem sila, dok se drugi ne može, dan je u slici 55.



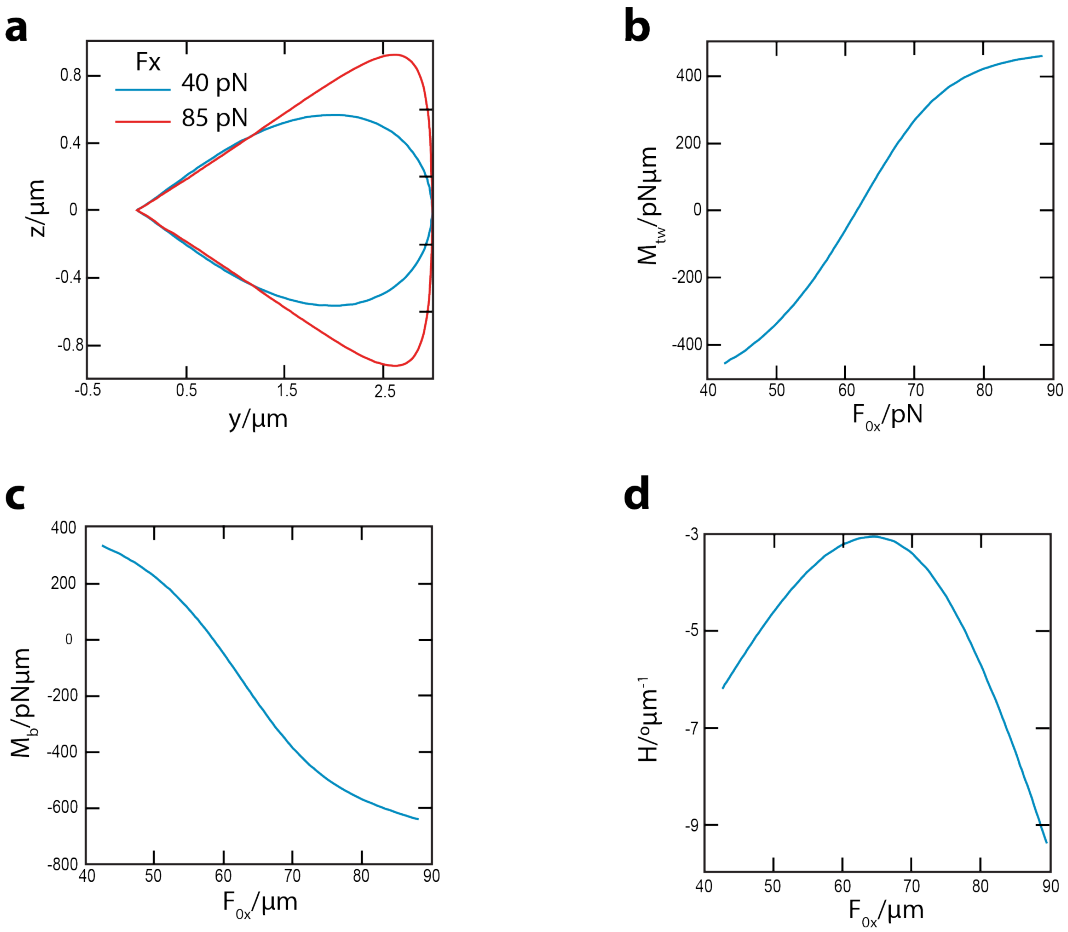
Slika 55: Dva primjera mjerenih kontura snopa mikrotubula u vertikalno položenom diobenom vretenu fiksirane HeLa stanice. C-oblik (a) i b)) i helikoidni oblik (c) i d)). a) i c) Postojanje momenata sila u lijevom i desnom polu mogu uspješno objasniti oba primjera. b) i d) Samo sila u polu, bez momenta sile, uspješno objašnjava C-oblik, no ne i helikoidni oblik. e) Histogram kvalitete prilagodbe za N=20 snopova mikrotubula u fiksiranim HeLa stanicama sa modelom u tri dimenzije koji uključuje samo momente sila u polovima, bez sile u smjeru spojnice polova. f) Histogram kvalitete prilagodbe za N=20 snopova mikrotubula u fiksiranim HeLa stanicama sa modelom u tri dimenzije koji uključuje samo sile u polovima.

Na slici 55 su prikazani i kumulativni histogrami za mjeru kvalitete prilagodbe, za koju smo uzeli mjeru analognu Pearson Chi-square statistici:

$$G.O.F. = \sum_{i=1}^{n} (x_i - E_i)^2 / n, \tag{4.2.1}$$

gdje je n broj eksperimentalno izmjerenih točaka oblika koje su korištene za prilagodbu modela.

Sile i momenti sila se nadopunjuju Model koji smo usporedili sa izmjerenim konturama snopova mikrotubula ima dva slobodna parametra, silu u smjeru glavne osi vretena i moment torzije. To otvara mogućnost uspješne prilagodbe modela za podskup u parametarskom prostoru, a ne samo za određenu kombinaciju parametara. Stoga smo istražili komplementarnost sila u smjeru spojnice polova i momenata sila. Slično kao što u primjeru ravninskih C-oblika imamo komplementarnost sila i momenata sila, takvu komplementarnost dobivamo i za općenite oblike u tri dimenzije. U slučaju takvih oblika nisu komplementarni samo sile i momenti sila, već i moment svijanja i moment torzije međusobno. Oblik smo fiksirali tako da ima kutni pomak $\Delta\alpha = 40^{\text{o}}$ i maksimalnu amplitudu u yz-projekciji od 3 µm. Također zahtijevamo simetriju oblika u odnosu na os koja spaja pol i točku $x = L/2$. Primjer takva dva oblika možemo vidjeti na slici 56 panel A. Iz simetrije oblika odmah dobivamo da vrijedi $F_{0z} = 0$ i $F_{0y} = -2M_{0z}/L$, te $M_{0z,l} = M_{0z,r}$ i $M_{0y,l} = -M_{0y,r}$. Zbog jednostavnosti, prvo smo istražili parametarski prostor za oblike kod kojih ne postoji komponenta momenta svijanja M_{0y}, tj. vrijedi $M_b = M_{0z}$.



Slika 56: Komplementarnost sila i momenata sila za simetrični oblik koji nastaje primjenom momenta torzije i antiparalelnog para momenata svijanja u polovima. a) Primjer dva ekstremna oblika koji se dobiju primjenom momenta torzije i simetričnog momenta svijanja. b) Moment torzije nije komplementaran sa silom u smjeru spojnice polova. c) Moment svijanja je komplementaran sa silom u smjeru spojnice polova. d) Helicitet u ovisnosti o sili u smjeru spojnice polova.

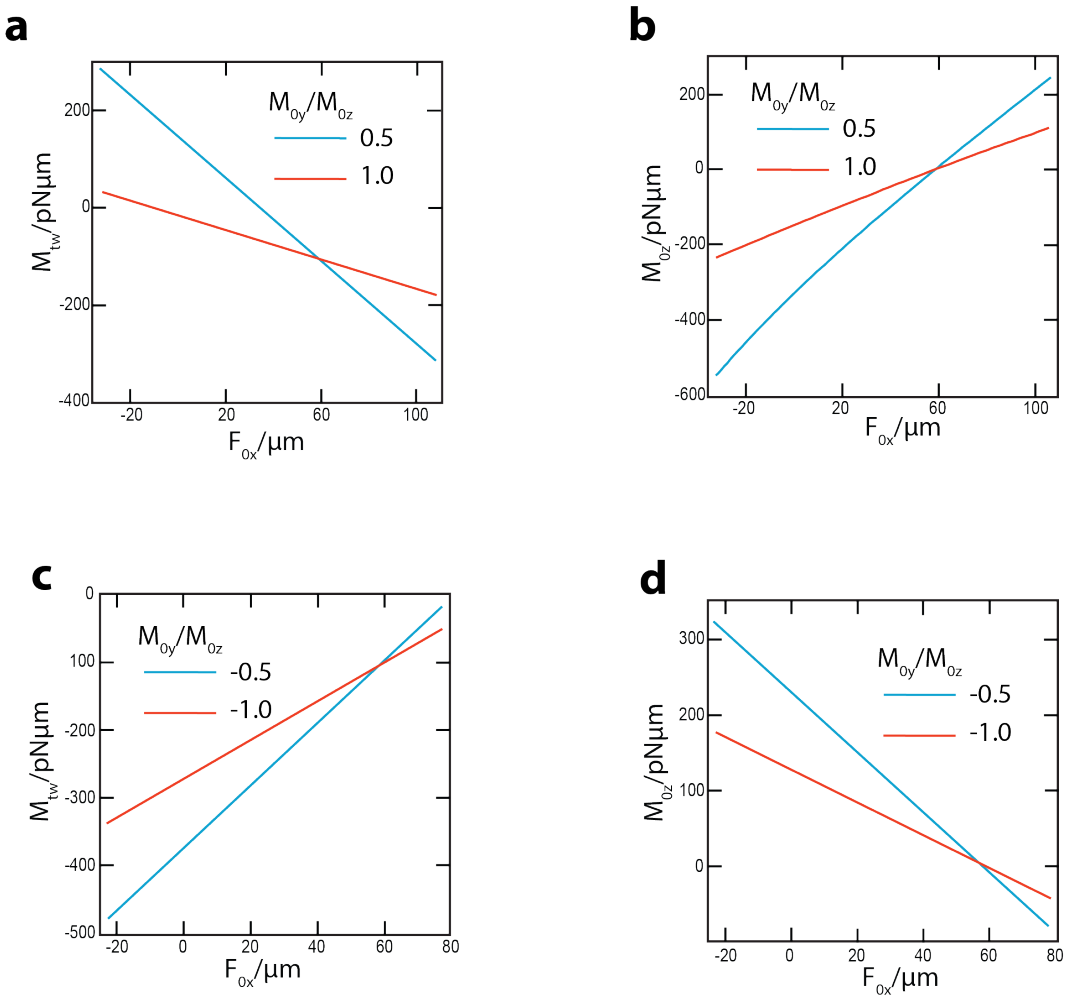
Iz rezultata prikazanih na slici 56 zaključujemo da su za antiparalelnu orijentaciju momenata svijanja u polovima, moment svijanja komplementaran s momentom torzije i da je moment svijanja komplementaran s silom u smjeru spojnice polova, što je ponovljeni zaključak koji smo dobili za oblike u dvije dimenzije. Možemo vidjeti da za silu $F_{0x} = 50$ pN iščezava moment svijanja i preostaje samo moment torzije od $\mathbf{M} = -300$ pNµm. Također vidimo da eksperimentalno poznavanje heliciteta izmjerenih oblika u $x = L/2$ dodatno ograničava područje sila u smjeru glavne osi diobenog vretena za gore zadane geometrijske parametre

oblika.

Dodatno smo proučili i komplementarnost sila i momenata sila za oblike kod kojih postoji i paralelni par momenata svijanja u polovima, M_{0y}, te vrijedi $M_{0y,l} = -M_{0y,r}$. U tu svrhu smo zadali međusobni omjer M_{0y}/M_{0z}, te istu geometriju kao i u gornjem slučaju. Ono što vidimo je da za negativan omjer imamo komplementarnost momenta torzije i sile, dok za pozitivan omjer imamo komplementarnost momenta svijanja i sile. Napominjemo da variramo silu F_{0x} unutar granica gdje postoji prvi mod deformacije, s obzirom da su viši modovi strukturno nestabilni.

4.3 Zaključak

U ovom poglavlju smo pokazali rezultate koji pokazuju da je diobeno vreteno lijeve kiralnosti, te da su oblici u središnjem dijelu uglavnom u tri dimenzije. Također smo pokazali da je za opis takvih oblika nužno djelovanje momenata sila u polovima, te da se ne mogu opisati isključivo djelovanjem sila u smjeru glavne osi vretena. Istražili smo komplementarnost momenata sila i sila u polovima i ustvrdili da ona postoji kod momenta svijanja i sila, kao i kod momenta svijanja i momenta torzije međusobno. Pokazali smo za određenu geometriju da je moguće identificirati točku u parametarskom prostoru gdje potpuno iščezava moment svijanja i oblik generira samo moment torzije.



Slika 57: Komplementarnost sila i momenata sila za oblik koji nastaje djelovanjem momenta torzije, te simetričnog i antisimetričnog momenta svijanja u polovima. a) Komplementarnost momenta torzije i sile u smjeru spojnice polova. b) Komplementarnost momenta svijanja i sile za oblike kod kojih je antiparalelni par momenata svijanja u polovima isti u predznaku kao paralelni moment svijanja u polovima. c) i d) isto kao a) i b), ali za oblike kod kojih je antiparalelni par momenata svijanja u polovima suprotnog predznaka od paralelnog para momenata svijanja u polovima.

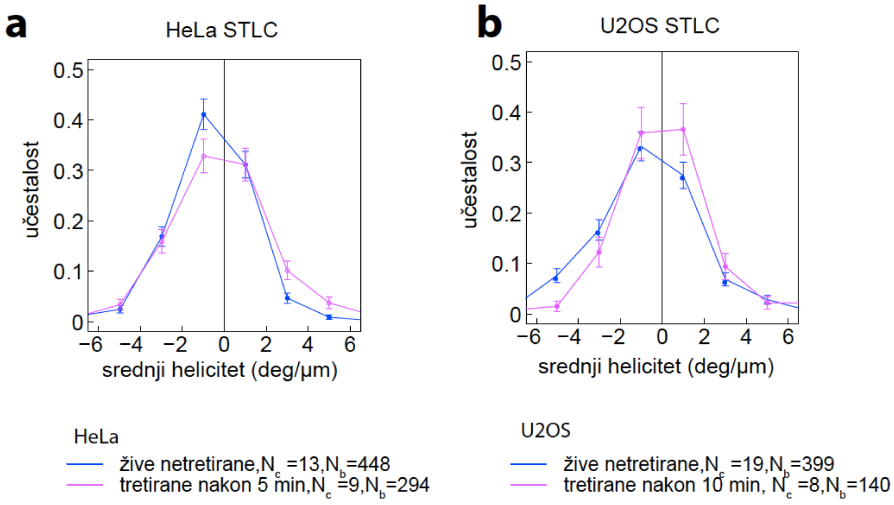
5 Eksperimentalna provjera modela: unutarnji dio diobenog vretena

Jednom kada je potvrđeno se opaženi oblici snopova mikrotubula dobivaju djelovanjem momenta torzije, predložili smo kandidata za generiranje torzije, molekularni motor kinezin-5, koji se u ljudskim stanicama naziva Eg5. Želimo provjeriti da li Eg5 motor doista uzrokuje opaženi helicitet i kiralnost u diobenom vretenu. Kako bismo stoga objasnili utjecaj djelovanja Eg5 motora na helicitet snopova mikrotubula, u suradničkom laboratoriju su dizajnirani eksperimenti u kojima je promijenjen afinitet za vezanje Eg5 motora, njegovu motornu aktivnost i njegovu koncentraciju u HeLa stanicama, te potom izračunat iz eksperimentalno mjerenih kontura snopova mikrotubula njihov helicitet u metafazi.

5.1 Perturbacija djelovanja molekularnog motora Eg5

5.1.1 Smanjenje afiniteta vezanja molekularnog motora Eg5

Kako bi se Eg5 motor odvezao od mikrotubula, primijenjen je spoj S-trityl-L-cysteine (STLC). Rezultati mjerenja heliciteta u U2OS stanicama prije i poslije djelovanja spoja STLC pokazuju značajno smanjenje heliciteta u U2OS stanicama, slika 58.

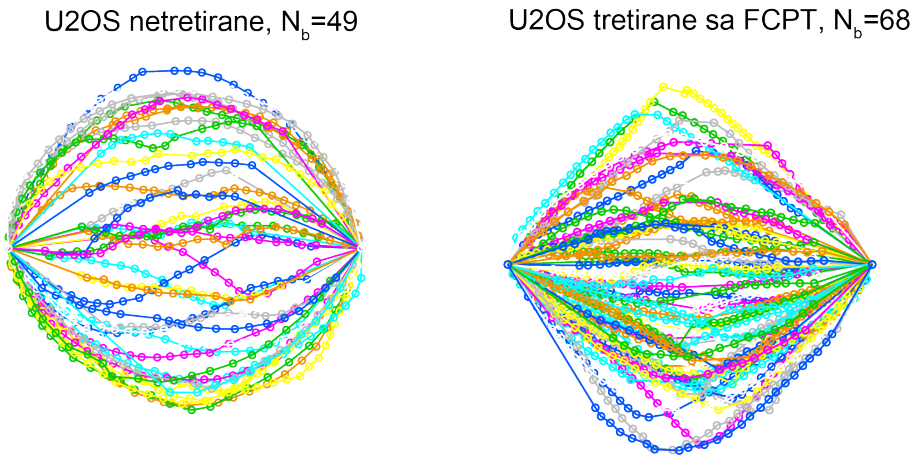


Slika 58: Histogrami heliciteta za HeLa i U2OS stanice prije i poslije tretiranja spojem STLC. N_c je broj analiziranih stanica u uzorku, a N_b broj analiziranih snopova mikrotubula u uzorku.

Taj rezultat je u skladu s opaženim kolapsom kontura snopova mikrotubula u jednu ravninu u snimkama vertikalno položenih stanica, gdje se vidi kako se snopovi radijalno protežu od polova prema periferiji. Produženo djelovanje spoja STLC (10 min) nije dovelo do daljnjeg smanjenja heliciteta. U pojedinim stanice, bez obzira da li su imale srednji pozitivni ili negativni helicitet, došlo je do relativnog smanjenja heliciteta.

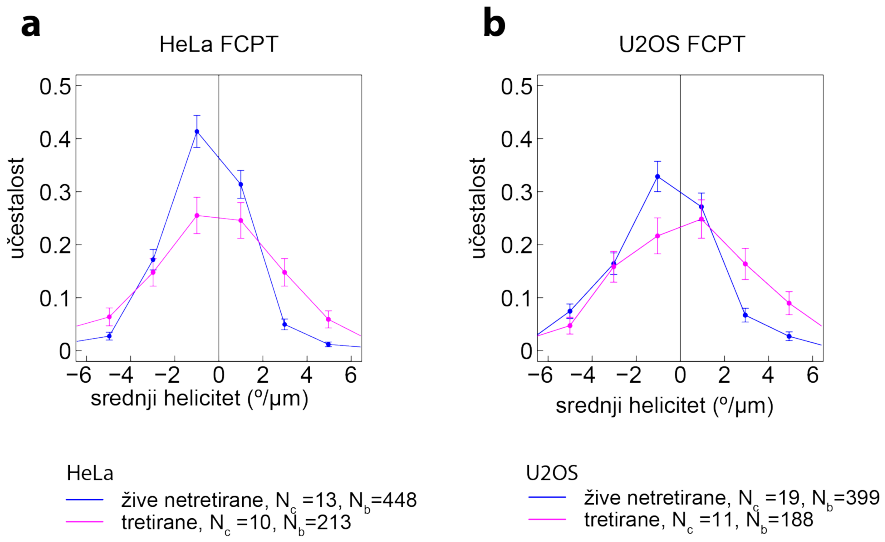
5.1.2 Smanjenje motorne aktivnosti molekularnog motora Eg5

Druga perturbacija koja je eksperimentalno moguća na Eg5 motorima je smanjenje njegove pokretljivosti, i to djelovanjem spoja 2-(1-(4-fluorophenyl)cyclopropyl)-4-(pyridin-4-yl)thiazole ili skraćeno FCPT, koji se kompetitivno veže s ATP molekulama na motornu domenu Eg5. Utjecaj FCPT spoja na diobeno vreteno se očituje smanjenjem zakrivljenosti vanjskih snopova mikrotubula. Dok su vanjski snopovi mikrotubula poprimili dijamantni oblik, također se smanjio udio opaženih S-oblika u sredini diobenog vretena. Usporedba tretirane i netretirane stanice je prikazana na slici 59.



Slika 59: Oblici snopova mikrotubula u U2OS stanicama prije i poslije tretiranja spojem FCPT.

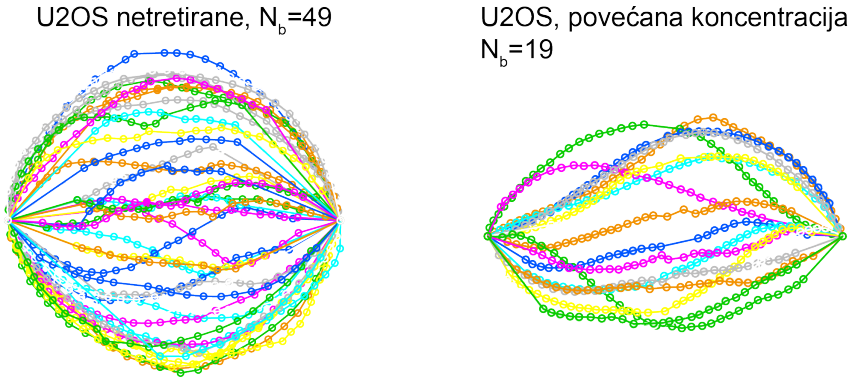
Na slici 60 možemo vidjeti da se kumulativni helicitet u tretiranim stanicama smanjio prema iščezavanju.



Slika 60: Histogrami heliciteta za HeLa i U2OS stanice prije i poslije tretiranja spojem FCPT. N_c je broj analiziranih stanica u uzorku, a N_b broj analiziranih snopova mikrotubula u uzorku.

5.1.3 Povećanje koncentracije molekularnog motora Eg5

Još jedan način da se utvrdi djelovanje motora Eg5 na oblike snopova mikrotubula jest genetsko pojačanje njegovog djelovanja. Opaženo je da su tipične stanice sa pojačanim djelovanjem Eg5 motora izdužene, te posjeduju mnogo S-oblika. Za takve stanice je posebno specifično postojanje S-oblika na periferiji, što do sada nije bilo opaženo u niti jednom eksperimentu perturbacije molekularnih motora, slika 61.



Slika 61: Oblici snopova mikrotubula u U2OS stanicama prije i nakon povećanja koncentracije Eg5.

S obzirom da su diobena vretena izdužena, nije bilo moguće pronaći vertikalno položena diobena vretena. Unatoč tome, povećanje zakrivljenosti, uz asimetriju, izmjerenih kontura u horizontalnim diobenim vretenima u odnosu na djelovanje spoja FCPT, upućuje da je smjer efekta povećanja koncentracije Eg5 motora na oblik snopova mikrotubula u smjeru povećanja torzije.

5.2 Zaključak

U ovom poglavlju smo identificirali molekularni motor Eg5 kao mogućeg kandidata za generiranje torzije, nužne za postojanje opaženih helikoidalnih oblika u diobenom vretenu. Dizajnirani su eksperimenti u kojima je perturbirana koncentracija Eg5 motora, njegova motorna aktivnost, kao i njegov afinitet vezivanja na mikrotubule. U slučaju pojačanog djelovanja Eg5 motora, usporedba eksperimenta i teorije potvrdila je postojanje većeg momenta torzije u sustavu, na temelju eksperimentalnog mjerenja heliciteta. U slučaju smanjenja motorne aktivnosti Eg5 motora došlo je do izravnavanja snopova mikrotubula, kao i u slučaju pojačanog odvezivanja Eg5 motora. U oba ta slučaja je iz izmjerenih kontura snopova mikrotubula dobiven manji helicitet nego za netretirane stanice. Iz svih tih rezultata možemo zaključiti da je motor Eg5 jedan od ključnih čimbenika koji sudjeluje u generiranju momenta torzije koji djeluje na snopove mikrotubula u metafaznom diobenom vretenu.

6 Zaključak i pregled

U ovom radu smo teorijski istražili koje sile i momenti sila oblikuju snopove mikrotubula u metafaznom diobenom vretenu, uz primjenu klasične teorije elastičnosti na tanke savitljive štapove. Naše rezultate možemo predstaviti u ovim točkama:

1. **Razvijen je model za vanjski dio diobenog vretena koji objašnjava koegzistenciju sila kompresije i tenzije u paru kinetohornih vlakana.** Točnije, na dio kinetohornog vlakna između točke spajanja i kinetohore djeluju sile tenzije, dok na zajednički snop koji se sastoji od kinetohornog i premosnog vlakna, kao i središnji dio premosnog vlakna, djeluju sile kompresije.

2. **Model za vanjski dio diobenog vretena predviđa silu na kinetohori u rasponu $F_k \approx 100-300\ pN$ i položaj točke spajanja u rasponu $x_j \approx 3-5\ \mu m$.** Rekonstruirane su konture kinetohornih vlakana i premosnog vlakna, te su određeni najrobusniji geometrijske parametre njihovih oblika: kut u polu, kut na kinetohori, duljinu i širinu diobenog vretena te horizontalni položaj kinetohore i debljinu premosnog vlakna. Koristili smo te geometrijske parametre i poznati elasticitet mikrotubula kako bismo parametrizirali naš model tri elastična štapa svinutih u dvije dimenzije. Na taj način smo ograničili dozvoljeno područje sila na kinetohori i položaja točaka spajanja.

3. **Model predviđa da na diobeno vreteno s debljim premosnim vlaknom djeluje veća sila u polu kako bi nastala ista ili približna geometrija kao za tipično diobeno vreteno. U našim eksperimentima smo to potvrdili mjerenjem odgovora na ablaciju za tri različite debljine premosnog vlakna.** Pretpostavili smo se da je odgovor odsječka kinetohornog i premosnog vlakna nakon rezanja brži ako je sila u polu veća. Brzinu izravnavanja kinetohornih i premosnog vlakna je eksperimentalno kvantificirana mjerenjem kuta nakošenja para kinetohora u odnosu na glavnu os diobenog vretena. U diobenom vretenu prije laserskog rezanja, kut nakošenja kinetohora je veoma blizu nuli, te se on nakon rezanja povećava. Potvrđeno je veći porast kuta nakošenja za staničnu liniju s debljim premosnim vlaknom nego za onu s manjim.

4. **Naš model predviđa dva moguća scenarija za relativni pomak kinetohora na-**

kon laserskog rezanja, ovisno o tome da li je prerezano kinetohorno vlakno između točke spajanja i pola ili točke spajanja i kinetohore. U našim eksperimentima smo ovo predviđanje potvrdili rezanjem vanjskog kinetohornog vlakna na više mjesta duž konture. U prvom slučaju će ostati sačuvana veza premosnog i kinetohornog vlakna, te će premosno vlakno nastaviti uravnoteživati tenziju između kinetohora i nakon rezanja, dok u drugom slučaju uravnoteženje sile tenzije neće biti moguće. U eksperimentima je mjerena udaljenost između kinetohora koja je korištena kao pokazatelj tenzije. Izmjerena je veća relaksacija (približavanje) kinetohora za rezove koji su bliže kinetohori, što ukazuje na gubitak tenzije na kinetohori, u skladu s našim modelom.

5. **Iz eksperimentalno mjerenih kontura snopova mikrotubula, tj. iz mjerenja njihovog heliciteta oko metafazne ravnine, utvrdili smo da je diobeno vreteno lijeve kiralnosti, te da su oblici u središnjem dijelu uglavnom trodimenzionalni.** Snimljena su i analizirana vertikalno položena diobena vretena metodom konfokalne fluorescencijske mikroskopije. U jednoj ravnini snimanja vertikalno položene stanice, signal snopova mikrotubula izgleda kao skup diskova intenziteta. Praćenjem centara tih diskova, tj. praćenjem snopova mikrotubula duž konture, utvrdili smo da su snopovi mikrotubula u metafazi trodimenzionalni, a ne ravninski, objekti.

6. **Momenti sila su nužni za objašnjenje postojećih oblika u vertikalnim stanicama, te sile tenzije i kompresije u polovima ne mogu same za sebe generirati oblike koje opažamo u eksperimentu.** Dok smo kod C-oblika u dvije dimenzije, u vanjskom dijelu diobenog vretena, direktno parametrizirali model na temelju usrednjenih geometrijskih karakteristika izmjerenih kontura snopova mikrotubula, ovdje smo parametrizaciju proveli na način da smo usporedili konturu svakog pojedinog snopa sa općenitim modelom u tri dimenzije, zadanim statičnom Kirchoffovom jednadžbom (2.2.1), i to u aproksimaciji malih kutova.

7. **Smanjenje momenta torzije objašnjava oblike kinetohornih vlakana nakon perturbacije djelovanja molekularnog motora Eg5 spojevima FCPT i STLC. Povećanje momenta torzije objašnjava oblike kinetohornih vlakana nakon**

povećanja djelovanja molekularnog motora Eg5. Identificirali smo molekularni motor Eg5 kao mogućeg kandidata za generiranje torzije, koja vodi do opaženih oblika u diobenom vretenu. U suradničkom laboratoriju su dizajnirani eksperimenti u kojima je perturbirana koncentracija Eg5 motora, njegova motornu aktivnost , kao i njegov afinitet vezanja na mikrotubule. U stanicama u kojima je djelovanje Eg5 inhibirano sa spojevima STLC i FCPT izmjeren je smanjeni helicitet u odnosu na kontrolne stanice, a u stanicama u kojima je povećana njegova koncentracija izmjeren je povećani helicitet u odnosu na kontrolne stanice.

Plan za budućnost Naš model je makroskopske prirode, te se postavlja pitanje o mikroskopskoj strukturi premosnog vlakna kao i o mikroskopskoj strukturi točke spajanja. Istraživanje mikroskopske strukture premosnog vlakna je dano u [87]. Iako trenutni model sugerira da tenzija koja djeluje na središnje snopove mikrotubula koegzistira s kompresijom u vanjskim snopovima mikrotubula, još uvijek nedostaje cjelovit i detaljan opis ravnoteže sila i momenata u centrosomu. Zanima nas postoji li i kako se manifestira kiralnost diobenog vretena u anafazi, i to promatranjem trajektorija kinetohora tijekom anafaze A. U konačnici bismo željeli razumjeti funkciju momenta torzije u živim stanicama. Za sada možemo spekulirati da momet torzije dozvoljava konačnu gornju granicu za međusobno grupiranje mikrotubula u snopove. Predlažemo eksperimente gdje bi se moduliranjem djelovanja motora Eg5 utjecalo na formiranje i raspadanje snopova mikrotubula. Potrebne su nove nezavisne potvrde o postojanju momenta torzije u diobenom vretenu, kao što je zakretanje individualnih mikrotubula u snopu, te kiralni smjer njihovog rasta. Takav eksperiment bi nam omogućio i indirektno mjerenje modula svijanja snopova mikrotubula.

A Aproksimacija malih kutova

A.1 Ravninski oblici

U aproksimaciji malih kutova, u skupu jednadžbi za ravninske oblike (2.2.9-2.2.11) isčezava član $(1+d^2y(x)/dx^2)^{3/2}$. Rješenje modela u aproksimaciji malih kutova je dano jednadžbama (2.2.12-2.2.14) i rubnim uvjetima (2.2.15-2.2.20). Skup rubnih uvjeta sačinjava homogeni sustav 7 jednadžbi sa 7 nepoznanica $A_{1,2,3}$, $\phi_{1,2,3}$, h_k. Determinanta sustava je polinom u parametru F_{0x} i mora isčezavati kako bi rješenje sustava bilo netrivijalno. Determinanta je dana s

$$D(F_{0x}) = A(F_{0x})(D_1(F_{0x}) + D_2(F_{0x}) + D_3(F_{0x}) + D_4(F_{0x}))$$

Pojedini članovi su dani s

$$A(F_{0x}) = \frac{1}{F_{0x}+F_k}\sqrt{\frac{F_{0x}+F_k}{\kappa_b}}exp\left(x_k\left(-\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}} - i\sqrt{\frac{F_{0x}+F_k}{\kappa_b}}\right) - \right. \tag{A.1.1}$$

$$\left. -ix_j\left(-i\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}} + \sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}} + \sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\right)\right),$$

$$D_1(F_{0x}) = \left(exp\left(2\left(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}} + i\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}} + i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\right)x_j\right) + exp\left(2\left(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}} + i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\right)\right)x_k\right)\times \tag{A.1.2}$$

$$\times\left(F_{0x}\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}\left(\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}} - \sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\right) - F_k\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}\left(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}} - i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\right)\right),$$

$$D_2(F_{0x}) = \left(exp\left(2\left(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}x_k + i\left(\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}} + \sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\right)x_j\right)\right) + exp\left(2\left(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}x_j + \right.\right.\right. \tag{A.1.3}$$

$$+i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)x_k\Bigg)\Bigg)\times\Bigg(F_{0x}\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}\Bigg(\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}-\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)-F_k\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}\Bigg(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}+i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)\Bigg),$$

$$D_3(F_{0x})=\Bigg(exp\Bigg(2\Bigg(i\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}x_j+\Bigg(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}+\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)x_k\Bigg)\Bigg)+exp\Bigg(2\Bigg(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}+ \tag{A.1.4}$$

$$+\ i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)\Bigg)x_j\Bigg)\times\Bigg(F_{0x}\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}\Bigg(\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}+\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)-F_k\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}\Bigg(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}-i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)\Bigg),$$

$$D_4(F_{0x})=\Bigg(exp\Bigg(2\Bigg(\Bigg(i\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}+\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}\Bigg)x_j+\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}x_k\Bigg)\Bigg)+exp\Bigg(2\Bigg(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}x_k+ \tag{A.1.5}$$

$$+\ i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)x_j\Bigg)\Bigg)\times\Bigg(F_{0x}\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}\Bigg(\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}+\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)-F_k\sqrt{\frac{F_{0x}}{\kappa_p}}\Bigg(\sqrt{\frac{F_k}{\kappa_k}}+i\sqrt{\frac{F_k+F_{0x}}{\kappa_b}}\Bigg)\Bigg).$$

Determinanta je realna u području $F_{0x}<-F_k$ i $F_{0x}>0$, dok je u području $-F_k<F_{0x}<0$ imaginarna. U točki $F_{0x}=0$, determinanta isčezava, što odgovara trivijalnom slučaju ravnog štapa, osim kada je sila F_k jednaka kritičnoj sili izvijanja štapa b. U točki $F_{0x}=-F_k$ determinanta također ima nultočku koja odgovara rješenju ravnog štapa kod kojeg nema sile kompresije u središnjem dijelu, tj. štapu b. Determinanta u općenitom slučaju može imati više nultočki u području $-F_k<F_{0x}$. Kako tražimo najstabilnije moguće rješenje, uzimamo nultočku koja je najbliža $F_{0x}=-F_k$, te koja predstavlja osnovni mod deformacije. Prva nultočka determinante je izračunata numerički, pomoću metode bisekcije.

A.2 Oblici u tri dimenzije

U aproksimaciji malih kutova statična Kirchoffova jednadžba za jedan elastični štap (2.2.1) prelazi u jednadžbe (2.2.38). Razlog tome je što možemo upotrijebiti slijedeće razvoje:

$$y = \epsilon y_1 + \epsilon^2 y_2 + ..., \tag{A.2.1}$$

$$z = \epsilon z_1 + \epsilon^2 z_2 + ..., \tag{A.2.2}$$

$$F_{0x,y,z} = F^0_{0x,y,z} + \epsilon F^1_{0x,y,z} + \epsilon^2 F^2_{0x,y,z} + ..., \tag{A.2.3}$$

$$M_{0x,y,z} = M^0_{0x,y,z} + \epsilon M^1_{0x,y,z} + \epsilon^2 M^2_{0x,y,z} + ..., \tag{A.2.4}$$

$$\tau \frac{d\phi}{ds} = C^0_{tw} + \epsilon C^1_{tw} + \epsilon^2 C^2_{tw} + ... \tag{A.2.5}$$

U nultom redu jednadžba (2.2.1) po komponentama je dana s

$$C^0_{tw} = -M^0_{0x}, \tag{A.2.6}$$

$$M^0_{0y} = -F^0_{0z} x \Rightarrow M^0_{0y} = 0,\ F^0_{0z} = 0, \tag{A.2.7}$$

$$M^0_{0z} = -F_{0y} x \Rightarrow M^0_{0z} = 0\ F^0_{0y} = 0. \tag{A.2.8}$$

U prvom redu jednadžba (2.2.1) po komponentama je dana s:

$$M^1_{0x} = 0, \tag{A.2.9}$$

$$-\kappa z_1''(x) + C^0_{tw} y_1'(x) = F^0_{0x} z_1(x) - F^1_{0z} x - M^1_{0y}, \tag{A.2.10}$$

$$\kappa y_1''(x) + C_{tw}^0 z_1'(x) = -F_{0x}^0 y_1(x) + F_{0y}^1 x - M_{0z}^1. \tag{A.2.11}$$

Kako možemo izabrati proizvoljni koordinatni sustav u gornje jednadžbe možemo uvrstiti $M_{0x} = M_{tw},\ M_{0y} = 0$ i $M_{0z} = M_b$.

Rubni uvjeti (2.2.45) određuju kostante $A_1,\ A_2,\ \phi_1,\ \phi_2$, te čine nehomogeni sustav četiri jednadžbe s četiri nepoznanice. Nakon rješenja tog sustava, nametnuli smo novi uvjet koji određuje kut u polu,

$$\sqrt{y_1'(0) + z_1'(0)} - \tan(20^{\mathrm{o}}) = 0. \tag{A.2.12}$$

Lijeva strana gornje jednadžbe, raspisana kao funkcija parametara modela, ima polove u točkama za koje vrijedi

$$\frac{L\sqrt{4F_{0x}\kappa + M_{tw}^2]}}{2\kappa} = n\pi. \tag{A.2.13}$$

Za pozitivni moment svijanja, polu koji odgovara vrijednosti $n = 1$ pridružena je nultočka s njegove lijeve strane na osi F_{0x}, te ta nultočka predstavlja osnovni mod deformacije oblika u tri dimenzije.

B Polinomijalna aproksimacija štapova

Istražili smo tri glavne geometrijske karakteristike ravninskih rješenja: silu u polu, koja direktno odgovara konkavnosti štapa p, položaj kinetohora u odnosu na štap b, te konkavnost štapa b. Aproksimirali smo elastične štapove Taylorovim razvojem do minimalnog reda koji je potreban za zadovoljiti Euler-Bernoullijevu jednadžbu, simetriju, kontinuiranost i glatkost, te geometrijsku karakteristiku od interesa.

B.1 Sila u polu

Oblik elastičnih štapova smo razvili na slijedeći način:

$$y_p = a_1 x + b_{,1} \tag{B.1.1}$$

$$y_k = a_2 x^3 + b_2 x, \tag{B.1.2}$$

$$y_b = a_3 x^4 + b_3 x^2 + c_3, \tag{B.1.3}$$

pri čemu smo koordinatni sustav postavili na način da je kinetohora na položaju $(0, 0)$ dok je položaj točke spajanja u točki $(-x_0, -y_0)$, te položaj pola u točki $(-L, -h)$. Zadali smo uvjet

$$F_{0x} = 0. \tag{B.1.4}$$

Riješili smo sustav 9 jednadžbi i 9 nepoznanica $a_{1,2,3},\ b_{1,2},\ c_3,\ h,\ y_0,\ F_k$:

$$y_p(-x_0) = -y_0, \tag{B.1.5}$$

$$y_p(-L) = -h, \tag{B.1.6}$$

$$y_k''(-x_0) = -F_k y_0, \tag{B.1.7}$$

$$y_k(-x_0) = -y_0, \tag{B.1.8}$$

$$\frac{\kappa_b}{\kappa_k} y_b''(0) = -(F_{0x} + F_k) y_b(0), \tag{B.1.9}$$

$$\frac{\kappa_b}{\kappa_k} y_b''(-x_0) = (F_{0x} + F_k) y_0, \tag{B.1.10}$$

$$y_b(-x_0) = -y_0, \tag{B.1.11}$$

$$y_p'(-x_0) = y_k'(-x_0), \tag{B.1.12}$$

$$y_b'(-x_0) = y_k'(-x_0). \tag{B.1.13}$$

Kao konačni rezultat, nakon eliminacije konstanti oblika $a_{1,2,3},\ b_{1,2},\ c_3,\ y_0,\ h$ dobiva se veza između sile na kinetohori F_k i položaja točke spajanja x_0 koji određuje faznu granicu između oblika sa konkavnim i konveksnim štapom b.

B.2 Položaj kinetohore

Kako bismo dobili faznu granicu za položaj kinetohore, oblik elastičnih štapova smo razvili na slijedeći način:

$$y_p = a_1 x + b_1, \tag{B.2.1}$$

$$y_k = a_2 x^3 + b_2 x, \tag{B.2.2}$$

$$y_b = a_3 x^4 + b_3 x^2. \tag{B.2.3}$$

Odabir koordinatnog sustava je isti kao i u prethodnom odjeljku. Član c_3 u razvoju štapa b iščezava zato jer se kinetohora nalazi na štapu b. Riješili smo sustav 9 jednadžbi i 9 nepoznanica $a_{1,2,3},\ b_{1,2},\ h,\ y_0,\ F_k,\ F_{0x}$:

$$y_p(-x_0) = -y_0, \tag{B.2.4}$$

$$y_p(-L) = -h, \tag{B.2.5}$$

$$y_k''(-x_0) = -F_k y_0, \tag{B.2.6}$$

$$y_k(-x_0) = -y_0, \tag{B.2.7}$$

$$\frac{\kappa_b}{\kappa_k} y_b''(0) = -(F_{0x} + F_k) y_b(0) - F_{0x} h, \tag{B.2.8}$$

$$\frac{\kappa_b}{\kappa_k} y_b''(-x_0) = (F_{0x} + F_k) y_0 - F_{0x} h, \tag{B.2.9}$$

$$y_b(-x_0) = -y_0, \tag{B.2.10}$$

$$y_p'(-x_0) = y_k'(-x_0), \tag{B.2.11}$$

$$y_b'(-x_0) = y_k'(-x_0). \tag{B.2.12}$$

Kao konačni rezultat, nakon eliminacije konstanti oblika $a_{1,2,3}$, $b_{1,2}$, c_3, y_0, h i sile u polu F_{0x} dobiva se veza između sile na kinetohori F_k i položaja točke spajanja x_0 koja određuje granicu između oblika sa kinetohorama ispod i iznad središnjeg štapa b.

B.3 Konkavnost štapa

Kako bismo dobili faznu granicu za oblike sa konkavnim štapom, oblik elastičnih štapova smo razvili na slijedeći način:

$$y_p = a_1 x^2 + b_1 x + c_1, \tag{B.3.1}$$

$$y_k = a_2 x^3 + b_2 x, \tag{B.3.2}$$

$$y_b = a_3x^4 + b_3x^2 + c_3. \tag{B.3.3}$$

Odabir koordinatnog sustava je isti kao i u prethodna dva odjeljka. U razvoju štapa p pojavljuje se drugi član zbog toga jer štap p mora imati konačnu zakrivljenost. Razlog tome je što zbroj zakrivljenosti štapa b i k u točki spajanja mora biti jednak zakrivljenosti štapa p, tj. mora vrijediti ravnoteža momenata sila. U gornjem slučaju zadajemo da je zakrivljenost štapa b jednaka nuli u točki spajanja. Riješili smo sustav 10 jednadžbi i 10 nepoznanica $a_{1,2,3},\ b_{1,2,3},\ c_3,\ h,\ y_0,\ F_k,\ F_{0x}$:

$$y_p(-x_0) = -y_0, \tag{B.3.4}$$

$$y_p(-L) = -h, \tag{B.3.5}$$

$$(1 + \frac{\kappa_b}{\kappa_k})y_p''(-x_0) = F_{0x}(y_0 - h), \tag{B.3.6}$$

$$y_k''(-x_0) = -F_k y_0, \tag{B.3.7}$$

$$y_k(-x_0) = -y_0, \tag{B.3.8}$$

$$\frac{\kappa_b}{\kappa_k}y_b''(0) = -(F_{0x} + F_k)y_b(0) - F_{0x}h, \tag{B.3.9}$$

$$\frac{\kappa_b}{\kappa_k}y_b''(-x_0) = 0, \tag{B.3.10}$$

$$y_b(-x_0) = -y_0, \tag{B.3.11}$$

$$y_p'(-x_0) = y_k'(-x_0), \tag{B.3.12}$$

$$y_b'(-x_0) = y_k'(-x_0). \tag{B.3.13}$$

Kao konačni rezultat, nakon eliminacije konstanti oblika $a_{1,2,3}$, $b_{1,2,3}$, c_3, y_0, h i sile u polu F_{0x} dobiva se veza između sile na kinetohori F_k i položaja točke spajanja x_0 koja određuje granicu između oblika sa konkavnim i konveksnim oblikom štapa b.

C Modul torzije snopa mikrotubula

Želimo povezati modul torzije jednog mikrotubula sa modulom torzije snopa mikrotubula u našem modelu, za slučaj fleksibilnog vezivanja mikrotubula u snop. Općeniti izraz za moment torzije snopa mikrotubula glasi:

$$M_{tw} = \sum_S M_{tw}^i sin(\alpha_i) + M_b^i cos(\alpha_i), \tag{C.0.1}$$

gdje su M_{tw}^i i M_b^i moment torzije i moment svijanja pojedinog mikrotubula indeksa i. Suma ide preko svih mikrotubula koji zauzimaju poprečni presjek S. Kut α_i je kut koji mikrotubul i zatvara sa obodom poprečnog presjeka snopa mikrotubula. Ako pretpostavimo da su poprečni presjeci zarotirani jedan u odnosu na drugi za infinitezimalni kut, tada vrijedi $\alpha_i = \pi/2 - d\phi_i$ i $M_{tw}^i = M_{tw}^0$, te je gornja suma dana s:

$$M_{tw} = \sum_S M_{tw}^0 (1 - \frac{d\phi_i^2}{2}) - \sum M_b^i d\phi_i \tag{C.0.2}$$

Ako zadržimo samo nulti red, tada vrijedi

$$M_{tw} = N_S M_{tw}^0 \Longrightarrow \tau = N_S \tau_0 \tag{C.0.3}$$

Zaključujemo da se za male kutove torzije i fleksibilno vezivanje mikrotubula u snop, u nultom redu, modul torzije snopa mikrotubula skalira s brojem mikrotubula u snopu.

Popis slika

1 Građa diobenog vretena u metafazi. 1
2 Građa i dinamika mikrotubula. 4
3 Građa i položaj kinetohore na kromosomu. 7
4 Faze diobe stanice. 9
5 Mikrotubuli kao generatori sila. 11
6 Molekularni motori, njihovo djelovanje i njihov položaj u diobenom vretenu. 12
7 Prostorna organizacija diobenog vretena u metafazi. 14
8 Mapa sila u diobenom vretenu u metafazi. 16
9 „Slide-and-cluster" model. 18
10 Model tekućeg kristala. 20
11 Primjena teorije elastičnosti na diobeno vreteno. 21
12 Teorijski prikaz geometrije tijela prije i poslije elastične deformacije. 22
13 Geometrija infinitezimalnog elementa tankog štapa. 29
14 Podjela konture tankog štapa na segmente. 30
15 Lokalni koordinatni sustavi u dvije točke duž konture tankog štapa. 31
16 Geometrija infinitezimalnog elementa tankog štapa koji trpi svijanje. 34
17 Hipoteza o ulozi premosnih mikrotubula. 39
18 Kinetohorno i premosno vlakno čine jedinstveni mehanički objekt. 40
19 Premosni mikrotubuli su antiparalelni. 42
20 Premosni mikrotubuli su dinamički. 43
21 Hipoteza o organizaciji diobenog vretena u metafazi. 44
22 Teorijski model koji opisuje snopove mikrotubula u diobenom vretenu. . . . 45
23 Teorijski model koji opisuje snopove mikrotubula u jednoj ravnini. 47
24 Klase rješenja modela u aproksimaciji malih kutova. 50
25 Fazne granice između oblika na koje djeluju sile tenzije i oblika na koje djeluju sile kompresije. 54
26 Fazne granice između oblika kod kojih su kinetohore položene iznad i ispod štapa b. 55

27 Fazne granice između oblika kod kojih je štap b konkavan i konveksan u blizini točke spajanja. 56
28 Teorijski model koji opisuje jedno vlakno u tri dimenzije. 58
29 Tri karakteristična rješenja modela za jedno vlakno u tri dimenzije. 61
30 Općeniti oblik u tri dimenzije koji opisuje tipični snop mikrotubula u sredini diobenog vretena. 61
31 Promjena simetrije C-oblika u ovisnosti o iznosu momenta svijanja na desnom polu. 62
32 Promjena kutnog pomaka sa povećanjem momenta torzije u sustavu ravninskog C-oblika. 63
33 Promjena kutnog pomaka sa rotacijom momenta svijanja na desnom kraju, u sustavu ravninskog C-oblika. 64
34 Promjena kutnog pomaka sa povećanjem momenta svijanja na desnom kraju, u sustavu asimetričnog oblika. 65
35 Prikaz sile u polu u smjeru spojnice polova u prostoru, za paralelnu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom polu. 66
36 Sila u smjeru spojnice u smjeru polova, u ovisnosti o momentu svijanja i momentu torzije za antiparalelnu orijentaciju i okomitu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom polu. 67
37 Kutni pomak za paralelnu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom polu. 67
38 Kutni pomak za antiparalelnu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom polu. 68
39 Kutni pomak za okomitu orijentaciju momenata svijanja na lijevom i desnom polu. 69
40 Parametrizacija modela pomoću geometrijskih karakteristika vanjskog snopa mikrotubula. 73
41 Teorijska reprodukcija eksperimentalno izmjerenog srednjeg oblika vanjskog snopa mikrotubula. 75

42 Komplementarnost sila i momenata sila u vanjskom snopu mikrotubula u diobenom vretenu. Sila u polu može nadomjestiti moment sile u polu. 76
43 Dozvoljeno područje parametarskog prostora za parametre modela. 78
44 Koegzistencija sila tenzije i sila kompresije u diobenom vretenu. 79
45 Sila u polu raste sa povećanjem broja mikrotubula u premosnom vlaknu. . . 80
46 Stanična linija s debljim premosnim vlaknom ima veći odgovor na lasersko rezanje. 81
47 Utjecaj debljine premosnog vlakna na karakteristike diobenog vretena. . . . 82
48 Dva moguća ishoda nakon laserskog rezanja vanjskog dijela diobenog vretena. 84
49 Nakon laserskog rezanja vanjskog dijela diobenog vretena, kinetohore se relaksiraju. 85
50 Hipoteza o mikroskopskoj strukturi točke spajanja. 86
51 STED snimka HeLa i U2OS stanica. 88
52 Snimka vertikalno položenog diobenog vretena HeLa stanice s obilježenim proteinom PRC1. 89
53 Prikaz modela diobenog vretena sa i bez momenta torzije u sustavu. 89
54 Histogrami heliciteta za HeLa i U2OS stanice. 90
55 Dva primjera mjerenih kontura snopa mikrotubula u vertikalno položenom diobenom vretenu fiksirane HeLa stanice. 92
56 Komplementarnost sila i momenata sila za simetrični oblik koji nastaje primjenom momenta torzije i antiparalelnog para momenata svijanja u polovima. 94
57 Komplementarnost sila i momenata sila za oblik koji nastaje djelovanjem momenta torzije, te simetričnog i antisimetričnog momenta svijanja u polovima. 96
58 Histogrami heliciteta za HeLa i U2OS stanice prije i poslije tretiranja spojem STLC. 97
59 Oblici snopova mikrotubula u U2OS stanicama prije i poslije tretiranja spojem FCPT. 98
60 Histogrami heliciteta za HeLa i U2OS stanice prije i poslije tretiranja spojem FCPT. 99

61 Oblici snopova mikrotubula u U2OS stanicama prije i nakon povećanja koncentracije Eg5. 100

Popis tablica

1 Popis ulaznih parametara za model snopova mikrotubula u dvije dimenzije, za vanjski dio diobenog vretena. 72

Literatura

[1] Pavin, N. & Tolic, I. M. Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle. *Annu. Rev. Biophys.* **45**, 279-298 (2016)

[2] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. Molecular Biology of the Cell 6th edition. *New York: Garland Science*, (2014)

[3] Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J. & Howard, J. Flexular rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* **120(4)**, 923-934 (1993)

[4] Sharp, D. J., Rogers, G. C. & Scoley, J. M. Microtubule motors in mitosis. *Nature* **407**, 41-47 (2000)

[5] Booth, D. G., Cheeseman, L. P., Prior, I. A. & Royle, S. J. Studying kinetochore-fiber ultrastructure using correlative light-electron microscopy. *Meth. Cell. Biol.* **115**, 327-342 (2013)

[6] McEwen, B. F., Heagle, A. B., Cassels, G. O., Buttle, K. F. & Rieder C. L. Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and ts implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J. Cell Biol.* **137**, 1567-1580 (1997)

[7] Mastronarde, D. N., McDonald, K. L., Ding, R. & McIntosh, J. R. Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *J Cell Biol.* **118**, 369-383 (1992)

[8] Howard, J. Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. *Sinauer Associates*,(2001)

[9] Rochlin, M. W., Dailey, M. E. & Bridgman, P. C. Polymerizing microtubules activate site-directed F-actin assembly in nerve growth cones. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2309-2327 (1999)

[10] Okuno, M. & Hiramoto, Y. Direct measurements of the stiffness of echinoderm flagella. *J. Exp. Biol.* **79**, 235-243 (1979)

[11] Kurz, J. C. & Williams, R. C. Microtubule-associated proteins and the flexibility of microtubules *Biochemistry* **34**, 13374-13380 (1995)

[12] Kolomeisky A. B. & Fisher M.E. Molecular Motors: A Theorist 's Perspective *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 675-695 (2007)

[13] McIntosh, J. R., Molodtsov, M. I. & Ataullakhanov F. I. Biophysics of Mitosis. *Q Rev Biophys* **45**, 147-207 (2012)

[14] Nixon, F. M., Gutierrez-Caballero, C., Hood, F. E., Booth, D. G., Prior I. A. & Royle, S. J. The mesh is a network of microtubule connectors that stabilises individual kinetochore fibers of the mitotic spindle. *eLife* **4** e07635 (2015)

[15] Alexander, S. P. & Rieder, C. L. Chromosome motion during attachment to the vertebrate spindle: initial saltatory-like behaviour of chromosomes and quantitative analysis of force production by nascent kinetochore fibers. *J. Cell Biol.* **113**, 805-815 (1991)

[16] Akiyosji, B., Sarangapani, K. K., Powers, A. F., Nelson, C. R., Reichow, S. L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J. A., Asbury, C. L. & Biggins, S. Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* **468**, 576-579 (2010)

[17] Mitchinson, T. J. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J. Cell Biol.* **109**, 755-765 (1989)

[18] Ault, J.G., Demarco, A. J., Salmon, E. D. & Rieder, C. L. Studies on the ejection properties of asters: astral microtubule turnover influences the oscillatory behavior and positioning of mono-oriented chromosomes. *J. Cell Sci.* **99**, 701-710 (1991)

[19] Rieder, C. L. & Salmon, E. D. Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J. of Cell Biol.* **8**, 310-318 (1994)

[20] Stumpff, J., von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C. & Wordeman, L. The kinezin-8 motor Kif18A suppresses kinetochor movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev. Cell* **14**, 252-262 (2008)

[21] Mussachio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *8*, 379-393 (2007)

[22] Landau, L. D. & Lifshitz, E. M. Theory of Elasticity (Course of Theoretical Physics, Volume 7). *Institute of Physical Problems, USSR Academy of Sciences: Pergamon Press* (1970)

[23] Wilson, E. B. & Gibbs, J. W. Vector Analysis: A Text-book for the Use of Students of Mathematics Physics: Founded Upon the Lectures of J. W. Gibbs. *Yale bicentennial pub: Scribner* (1901)

[24] Martin, P. C., Parodi, O. & Pershan, P. S. Unified Hydrodynamic Theory for Crystals, Liquid Crystals, and Normal Fluids *Phys. Rev. A* **6**, 2401-2420 (1972)

[25] Wollman, R., Civelekoglu-Scholey, G., Sholey, J., M. & Mogilner, A. Reverse Engineering of force integration during mitosis in the *Drosophila* embryo. *Mol. Syst. Biol.* **4**, 195 (2008)

[26] Gorbsky, G. J., Sammak, P. J. & Borisy, G. G. Chromosomes move poleward in anaphase along stationary microtubules that coordinately disassemble from their kinetochore ends. *J. Cell Biol.* **104**, 9-18 (1987)

[27] Mitchinson, T., Evans, L., Schulze, E. & Kirschner, M. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell* **45**, 515-27 (1986)

[28] Dumont, S. & Michinson, T. J. Force and length in the mitotic spindle. *Curr. Biol.* **19(17)**, 749-761, (2009)

[29] Zhai, Y., Kronebusch, P. J. & Borisy G. G. Kinetochore microtubule dynamics and the metaphase-anaphase transition. *J. Cell Biol.* **131**, 721-734 (1995)

[30] Inoue, S. & Salmon, E. D. Force Generation by Microtubule Assembly/Disasemblly in Mitosis and Related Movements. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1619-1640 (1995)

[31] Ems-McClung, S. C., Walczak, C. E. Kinesin-13s in Mitosis: Key Players in the Spatial and Temporal Organisation of Spindle Microtubules. *Semin Cell Dev. Biol.* **21(3)**, 276-282 (2010)

[32] Coue, M., Lombillo, V. A. & McIntosh J. R. Microtubule depolymerisation promotes particle and chromosome movement in vitro. *J. Cell. Biol.* **112(6)** 1165-1175 (1991)

[33] Peskin, C., S., Odell, G. M. & Oster, G. F. Cellular motions and thermal fluctuations - the Brownian ratchet. *Biophys. J.* **65** 316-324 (1993)

[34] Dogterom, M., Kerssemakers, J. W., Romet-Lemonne, G. & Janson, M. E. Force generation by dynamic microtubules. *Curr. Op. Cell Biol.* **17**, 67-74 (2005)

[35] Sprague, B. L., Pearson, C. G., Maddox P. S., Bloom K. S., Salmon E. D. & Odde D. J. Mechanisms of microtubule-based kinetochore positioning in the yeast metaphase spindle. *Biophys. J.* **84**, 3529-3546 (2003)

[36] Civelekoglu-Scholey, G., He, B., Shen, M., Wan, X., Roscioli, E., Bowden, B. & Cimini, D. Dynamic bonds and polar ejection force distribution explain kinetochore oscillations in PtK1 cells. *J. Cell Biol.* **201(4)**, 577-593 (2013)

[37] Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. & Chang F. A mechamism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing *J Cell Biol* **153**, 397-411 (2001)

[38] Pearson, C. G. & Bloom, K. Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 1181-1186 (2004)

[39] Mitchinson, T. J. & Salmon, E. D. Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase-A in newt lung cell mitosis. *J. Cell. Biol.* **119** 569-582 (1992)

[40] Tao, L., Mogilner, A., Civelekoglu-Scholey, G., Wollman, R., Evans, J., Stahlberg, H., & Scholey, J. M. A homotetrameric kinesin-5, KLP61F, bundles microtubules and antaginizes Ncd in motility assays *Curr. Biol.* **16**, 2293-2302 (2006)

[41] Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Kwon, M., Mogilner, A., & Scholey, J. M. Model for Anaphase B: role of three mitotic motors in a switch from poleward flux to spindle elongation *PNAS* **101**, 15938-15943 (2004)

[42] Maney, T., Hunter, A. W. Wagenbach, M. & Wordeman, L. Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J. Cell Biol.* **142**, 787-801 (1998)

[43] Yajima, J., Edamatsu, M., Watai-Nishii, J., Tokai-Nishizumi, N., Yamamoto, T. Toyoshima, Y. Y. The human chromokinesin Kid is a plus end-directed microtubule-based motor. *EMBO J.* **22**, 1067-1074 (2003)

[44] Rieder, C. L., Davison, E. A., Jensen, L. C., Cassimeris, L. & Salmon, E. D. Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. *J. Cell Biol.*, **103**, 581-591 (1986)

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

[46] Begg, D. A. & Ellis, G. W.Micromanipulation studies of chromosome movement. I. Chromosome-spindle attachment and the mechanical properties of chromosomal spindle fibers. *J. Cell Biol.* **82**, 528-541 (1979)

[47] Dumont, S. & Mitchinson, T. J. Compression regulates spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr. Biol.* **19**, 1086-1095

[48] McNeil, P. A. & Berns, M. W. Chromosome behaviour after laser microirradiation of a single kinetochore in mitotic PtK2 cells. *J. Cell. Biol.* **88**, 543-553 (1981)

[49] Waters, J. C., Skibbens, R. V. & Salmon, E. D. Oscillating mitotic newt lung cell kinetochores are, on average, under tension and rarely push. *J. Cell Sci.* **109**, 2823-2831 (1996)

[50] LaFountain, J. R. Spindle shape changes as an indicator of force production in crane-fly spermatocites. *J. Cell Sci.* **10**, 79-93 (1972)

[51] DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A. & Salmon, E. D. Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* **127**, 969-982 (2006)

[52] Pickett-Heaps, J. D., Forer, A. & Spurck, T. Traction fibre: toward a "tensegral" model of the spindle. *Cell Motil. Cytoskeleton* **37**, 1-6 (1997)

[53] Mitchinson, T. J., Maddox, P., Gaetz, J., Groen, A. C., Shirazu, M., Desai, A., Salmon, E. D. & Kapoor, T. M. Roles of polymerization dynamics, opposed motors, and a tensile element in governing the length of Xenopus extract meiotic spindles. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3064-3076 (2005)

[54] Dionne, M. A., Howard, L. Compton, D. A. NuMa is a component of an insoluble matrix at mitotic spindle poles. *Cell Motil. Cyto.* **42**, 189-203 (1999)

[55] Walker, D. L., Wang, D., Jin, Y., Rath, U., Wang, Y., Johansen, J Johansen, K. M. Skeletor, a novel chromosomal protein that redistributes during mitosis provides evidence for the formation of a spindle matrix. *J. Cell Biol.* **151**, 1401-1412 (2000)

[56] Chang, P., Jacobson, M. K. Mitchinson, T. J. Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure. *Nature* **432**, 645-649 (2004)

[57] Lu, L., Ladinsky, M. S. and Kirchhausen, T. Cisternal organisation of the endoplasmic reticulum during mitosis. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3471-3480 (2009)

[58] Burbank, K. S., Mitchinson, T. J. & Fisher, D. S. Slide-and-Cluster Models for Spindle Assembly. *Curr. Biol.* **17**, 1373-1383 (2007)

[59] Loughlin, R., Heald, R. & Nédélec, F. A computational model predicts Xenopus meiotic spindle organization *J. Cell. Biol.*,**191** 1239-1249

[60] Brugues, J. & Needleman D. J. Physical basis of spindle self-organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 18496-18500 (2014)

[61] Brugues, J., Nuzzo, V., Mazur, E., & Needleman, D. J. Nucleation and Transport Organize Microtubules in Metaphase Spindles. *Cell* **149**, 554-564 (2012)

[62] Rubinstein, B., Larripa, K., Sommi, P. & Mogilner A. The elasticity of motor-microtubule bundles and shape of the mitotic spindle. *Phys. Biol.* **6**, 016005-016020 (2009)

[63] Hentrich, C., & Surrey. T. Microtubule organization by the antagonistic mitotic motors kinesin-5 and kinesin-14. *J. Cell Biol.* **189**, 465-480 (2010)

[64] Merdes, A., Heald, R., Samejima, K., Earnshaw, W. C. & Cleveland. D. W. Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J. Cell Biol.* **149**, 851-862 (2000)

[65] Kapitein, L. C., Peterman, E. J., Kwok, B. H., Kim, J. H., Kapoor, T. M. & Schmidt, C., F. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature*, **435** 114-122 (2005)

[66] Kajtez, J., Solomatina, A., Novak, M., Polak B., Vukušić K., Rüdiger, J., Cojoc, G., Milas, A., Šumanovac Šestak, I., Risteski, P., Tavano, F., Klemm, A. H., Roscioli, E., Welburn, J., Cimini, D., Glunčić, M., Pavin, N. & Tolić, I. M. Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores *Nat. Comm.* **7**, 10298-10309 (2016)

[67] Ohi, R., Coughlin, M. L., Lane, W. S. & Mitchinson, T. J. An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerising activity of a KinI kinesin. *Dev. Cell.* **5**, 309-321 (2003)

[68] Jensen, C. G. Dynamics of spindle microtubule organisation: kinetochore fiber microtubules of plant endosperm. *J. Cell Biol.* **92**, 540-558 (1982)

[69] Paddock, S. W. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol. Biotechnol.* **16(2)**, 127-149 (2000)

[70] Nicklas, R. B. The forces that move chromosomes in mitosis. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 431-449 (1988)

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

[72] Sheykhani, R., Baker, N., Gomez-Godinez, V., Liaw, L. H., Shah J., Berns M. W. & Forer A. The role of actin and myosin in PtK2 spindle length changes induced by laser microbeam irradiations across the spindle. *Cytoskeleton (Hoboken)* **70**, 241-259 (2013)

[73] Sikirzhytski, V., Magidson, V., Steinman, J. B., He, J., Le Berre, M., Tikhonenko, I., Ault, J. G., McEwen, M. F., Chen, J. K., Sui, H., Piel, M., Kapoor, T. M. & Khodjakov, A. Direct kinetochore-spindle pole connections are not required for chromosome segregation. *J. Cell. Biol.* **206**, 231-243 (2014)

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

[75] Zhu, C., Lau, E., Schwarzenbacher, R., Bossy-Wetzel, E. & Jiang, W. Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells.*Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 6196-6201 (2006)

[76] Polak, B., Risteski, P., Lesjak S. & Tolić, I. M. 2PRC1-labeled Microtubule Bundles and Kinetochore Pairs Show One-to-one Association in Metaphase. *EMBO Rep.* **18** 217-230 (2016)

[77] Wendell, K. L., Wilson, L. & Jordan, M. A. Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. *J. Cell Sci.* **104**, 261-274 (1993)

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

[79] Dong, Y., Van den Beldt, K. J., Meng, X., Khodjakov, A. & McEwen, B. F. The outer plate in vertebrate kinetochores is a flexible network with multiple microtubule interactions. *Nat. Cell Biol.* **9**, 516-522 (2007).

[80] Nicklas, R. B. Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *J. Cell Biol.* **97**, 542-548 (1983)

[81] Müller, T., Schumman, C. & Kraegeloh, A. STED microscopy and its applications: new insights into cellular processes on the nanoscale. *Chemphyschem.* **13(8)**, 1986-2000 (2012)

[82] Yajima, J., Mizutani, K. & Nishizaka, T. A torque component present in mitotis kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1119-1121 (2008)

[83] Y. Shi & J. E. Hearst, The Kirchhoff Elastic Rod, the Nonlinear Schroedinger Equation and DNA Supercoiling. *J. Chem. Phys.* **101**, 5186-5200 (1994)

[84] Yasuda, R., Miyata, H. and Kinosita, K. Direct Measurement of the Torsional Rigidity of Single Actin Filaments. *J. Mol. Biol.* **263**, 227-236 (1996)

[85] Mayer, M., Depken, M., Bois, J., Jülicher F., Grill, S. W. Anisotropies in cortical tension reveal the physical basis of polarizing cortical flows. *Nature* **467.7315**, 617-621 (2010)

[86] Naganathan, S. R., Fürthauer, S., Nishikawa, M., Jülicher, F. & Grill, S. W. Active torque generation by the actomyosin cell cortex drives left-right symmetry breaking. *e-Life***e04165**, 1-16 (2014)

[87] Vukusić, K., Buđa, R., Bosilj, A., Milas, A., Pavin, N. & Tolić, I. M. Microtubule sliding in the bridging fiber pushes kinetochore fibers apart to segregate chromosomes. *Dev. Cell*, *In press*

Životopis Maja Novak rođena je 9. listopada 1984. godine. Diplomirala je na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2009. godine s temom "Spinsko-izospinska pobuđenja u nuklearnim jezgrama". Od 2009. do 2010. godine volontirala je u Zavodu za eksperimentalnu fiziku Instituta "Ruđer Bošković", u laboratoriju za sudare teških iona, te na toj istoj instituciji 2010. radila na projektu SPIRIT. U razdoblju od 2010. do 2013. znanstveno se je usavršavala na institutima GANIL i SUBATECH u Francuskoj, te GSI u Njemačkoj. Od 2014. godine zaposlena je kao asistent i stručni suradnik na UKF projektu, na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a od 2015. godine kao stručni suradnik na ESF projektu u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta "Ruđer Bošković", u laboratoriju Ive Tolić. Do sada je objavila 4 znanstvena rada u CC časopisima, tri u području nuklearne fizike, *Symmetry energy from elliptic flow in 197Au+197Au.* (Physics Letters B, 2011), *The ASY-EOS Experiment at GSI.* (The European Physical Journal Web of Conference, 2016), *Results of the ASY-EOS experiment at GSI: The symmetry energy at suprasaturation density.* (Physical Review C, 2016), te jedan u području biofizike, *Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores.* (Nature Communications, 2015). Od nastavne je djelatnosti bila zadužena za kolegije Kvantna fizika, Građa računala i Računalni praktikum za nastavničke smjerove.

Lista radova

- *Overlap microtubules link sister k-fibers and balance the forces on bioriented kinetochores.* Janko Kajtez*, Anastasia Solomatina*, Maja Novak*, Bruno Polak, Kruno Vukušić, Jonas Rüdiger, Gheorghe Cojoc, Ana Milas, Ivana Šumanovac Šestak, Patrik Risteski, Federica Tavano, Anna H. Klemm, Emanuele Roscioli, Julie Welburn, Daniela Cimini, Matko Glunčić, Nenad Pavin, Iva M. Tolić (*-dijeljeni prvi autori), *Nature Communications,* **7**:10298 (2016)

- *Results of the ASY-EOS experiment at GSI: The symmetry energy at suprasaturation density.* P. Russotto1, S. Gannon, S. Kupny, P. Lasko, L. Acosta , M. Adamczyk, A. Al-Ajlan, M. Al-Garawi, S. Al-Homaidhi, F. Amorini, L. Auditore, T. Aumann, Y. Ayyad, Z. Basrak, J. Benlliure, M. Boisjoli, K. Boretzky, J. Brzychczyk, A. Budzanowski, C.

Caesar, G. Cardella, P. Cammarata, Z. Chajecki, M. Chartier, A. Chbihi, M. Colonna, M. D. Cozma, B. Czech, E. De Filippo, M. Di Toro, M. Famiano, I. Gašparić, L. Grassi, C. Guazzoni, P. Guazzoni, M. Heil, L. Heilborn, R. Introzzi, T. Isobe, K. Kezzar, M. Kiš, A. Krasznahorkay, N. Kurz, E. La Guidara, G. Lanzalone, A. Le Fèvre, Y. Leifels, R. C. Lemmon, Q. F. Li, I. Lombardo, J. Łukasik, W. G. Lynch, P. Marini, Z. Matthews, L. May, T. Minniti, M. Mostazo, A. Pagano, E. V. Pagano, M. Papa, P. Pawłowski, S. Pirrone, G. Politi, F. Porto, W. Reviol, F. Riccio, F. Rizzo, E. Rosato, D. Rossi, S. Santoro, D. G. Sarantites, H. Simon, I. Skwirczynska, Z. Sosin, L. Stuhl, W. Trautmann, A. Trifirò, M. Trimarchi, M. B. Tsang, G. Verde, M. Veselsky, M. Vigilante, Yongjia Wang, A. Wieloch, P. Wigg, J. Winkelbauer, H. H. Wolter, P. Wu, S. Yennello, P. Zambon, L. Zetta, and M. Zoric, *Phys. Rev. C* **94**, 034608 (2016)

- *The ASY-EOS experiment at GSI.* Russotto, P.; Chartier, M.; Cozma, M.D.; De Filippo, E.; Le Fèvre, A.; Gannon, S.; Gašparić, Igor; Kiš, Mladen; Kupny, S.; Leifels, Y.; Lemmon, R.C.; Li, Q.; Aukasik, J.; Marini, P.; Pawłowski, P.; Trautmann, W.; Acosta, L.; Adamczyk, M.; Al-Ajlan, A.; Al- Garawi, M.; Al-Homaidhi, S.; Amorini, F.; Auditore, L.; Aumann, T.; Ayyad, Y.; Baran, V.; Basrak, Zoran; Bassini, R.; Benlliure, J.; Boiano, C.; Boisjoli, M.; Boretzky, K.; Brzychczyk, J.; Budzanowski, A.; Cardella, G.; Cammarata, P.; Chajecki, Z.; Chbihi, A.; Colonna, M.; Czech, B.; Di Toro, M.; Famiano, M.; Greco, V.; Grassi, L.; Guazzoni, C.; Guazzoni, P.; Heil, M.; Heilborn, L.; Introzzi, R.; Isobe, T.; Kezzar, K.; Krasznahorkay, A.; Kurz, N.; La Guidara, E.; Lanzalone, G.; Lasko, P.; Lombardo, I.; Lynch, W.G.; Matthews, Z.; May, L.; Minniti, T.; Mostazo, M.; Pagano, A.; Papa, M.; Pirrone, S.; Pleskac, R.; Politi, G.; Porto, F.; Reifarth, R.; Reisdorf, W.; Riccio, F.; Rizzo, F.; Rosato, E.; Rossi, D.; Santoro, S.; Simon, H.; Skwirczynska, I.; Sosin, Z.; Stuhl, L.; Trifirò, A.; Trimarchi, M.; Tsang, M.B.; Verde, G.; Veselsky, M.; Vigilante, M.; Wieloch, A.; Wigg, P.; Wolter, H.H.; Wu, P.; Yennello, S.; Zambon, P.; Zetta, L.; Zoric, Maja, *The European Physical Journal - Web of Conference,* **117**:07010 (2016)

- *Dynamical description of exotic structures at subnuclear densities.* de la Mota, Virginia; Sébille, François; Novak, Maja; Eudes, Phillipe, *Journal of Physics: Conference Series,*

436:012067 (2013)

- *Constancy of energy partition in central heavy-ion reactions at intermediate energies.* Basrak, Zoran; Eudes, Phillipe; Zoric, Maja; Sébille, François, *Journal of Physics: Conference Series*, **420**:012101 (2013)

- *Symmetry energy from elliptic flow in 197Au + 197Au.* Russotto, Paolo; Wu, Peter Z.; Zoric, Maja; Chartier, Marielle; Leifels, Yvonne; Lemmon, Roy C.; Li, Q.; Jerzy, Lukasik; Pagano, Angelo; Pawlowski, Piotr; Trautmann, Wolfgang, *Physics letters. B.* **697, 5**; 471-476 (2011).