Teorijski opis uloge premosnih mikrotubula u diobenom vretenu

Bosilj, Agneza

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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:217:477414

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-13**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Agneza Bosilj

Teorijski opis uloge premosnih mikrotubula u diobenom vretenu

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Agneza Bosilj

Teorijski opis uloge premosnih mikrotubula u diobenom vretenu

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2020

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF PHYSICS

Agneza Bosilj

Theoretical description of the bridging microtubules role in the mitotic spindle

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2020

Ovaj doktorski rad izrađen je pod vodstvom 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 Professor Nenad Pavin, Phd, within University post-graduate studies at Physics Department of Faculty of Science, University of Zagreb.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Nenadu Pavinu za svu pomoć pri izradi ovog rada, za sve konstruktivne razgovore i kritike i entuzijazam za znanstveni rad te također prof. dr. sc. Ivi Tolić za pomoć pri usporedbi teorijskih modela s eksperimentima i nadahnuće i pomoć pri pisanju znanstvenih članaka. Zahvaljujem se i svim članovima Pavin i Tolić grupe za veselu radnu atmosferu i svakodnevnu podršku u radu!

SAŽETAK

Tijekom stanične diobe, diobeno vreteno dijeli genetski materijal u dvije identične stanice kćeri. Kinetohorni mikrotubuli u diobenom vretenu povezuju kromosome s polovima vretena i generiraju sile na kromosome putem proteinskih kompleksa zvanih kinetohore. Eksperimentalnim mjerenjima uočeni su premosni mikrotubuli koji su stabilno vezani za kinetohorne mikrotubule te su u ovom radu razvijeni fizikalni modeli koji razjašnjavaju njihovu ulogu tijekom stanične diobe. Uz kinetohorne i premosne mikrotubule i kinetohore, pri izradi modela uključena je interakcija mikrotubula s polovima diobenog vretena te pasivni i aktivni molekularni motori koji lateralno povezuju kinetohorne i premosne mikrotubule i omogućuju njihovo klizanje te aktivni motori koji reguliraju dinamiku mikrotubula. Za slučaj staničnog sustava koji se nalazi u metafazi, rješenja modela pokazuju da aktivni motori na plus krajevima mikrotubula, reguliraju prijelaz mikrotubula iz faze rasta u fazu skraćivanja te time ograničavaju kretanje kinetohora na središnju trećinu diobenog vretena. Model predviđa da stohastički član u modelu osigurava robustnost pri kretanju kinetohora za veliki raspon parametara. Također, za slučaj metafaznog diobeog vretena koje sadrži premosne mikrotubule, predviđanje je modela da će kinetohore izmaknute od središta diobenog vretena postići novi stabilni položaj koji korelira s pozicijom svežnja premosnih mikrotubula. Za slučaj sustava koji opisuje diobeno vreteno u anafazi pokazali smo da lateralno klizanje između premosnih i kinetohornih mikrotubula generirano aktivnim motorima koji se nalaze u antiparalelnim preklopima svežnjeva mikrotubula omogućuje robusnu separaciju kromosoma koja je neovisna od sila generiranih na polovu diobenog vretena.

Ključne riječi: diobeno vreteno, premosni mikrotubuli, metafaza, anafaza, pozicioniranje, oscilacije, Langevinova jednadžba

ABSTRACT

During mitosis, mitotic spindle segregates genetic material into two identical daughter cells. Kinetochore microtubules in the mitotic spindle connect the chromosomes to the spindle poles and generate forces on the chromosomes via protein complexes called kinetochores. Measurements have shown that bridging microtubules are stably bound to kinetochore microtubules and in this thesis we developed physical models that clarify their role during cell division. In addition to kinetochore microtubules, bridging microtubules and kinetochores, the model includes the interaction of microtubules with the poles of the mitotic spindle and passive and active molecular motors that laterally connect kinetochore and bridging microtubules and enable their sliding and active motors that regulate dynamics of the microtubule plus ends. For the case of a system that is in metaphase, the model solutions show that active motors at the plus ends of microtubules regulate the transition of microtubules from the growing phase to the shrinking phase and thus limit the movement of kinetochores to the central third of the mitotic spindle. The model predicts that the stochastic contribution in the model provides robustness in the motion of the kinetochore for a wide range of parameters. Also, for the case of a metaphase spindle, that contains bridging microtubules, the model predicts that the kinetochores away from the center of the spindle will achieve a new stable position that correlates with the position of the bridging microtubules overlap. For the case of a system describing the mitotic spindle in anaphase, we have shown that lateral sliding between bridging and kinetochore microtubules generated by active motors located in the antiparallel microtubule bundles allows robust chromosome separation independent of forces generated at the spindle pole.

Keywords: mitotic spindle, bridging microtubules, metaphase, anaphase, positioning, oscillations, Langevin equation

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Cell division is a fundamental process in the living world guided by a mitotic spindle, a complex cellular structure composed of microtubules and associated motor and passive proteins. Microtubules in the mitotic spindle are connected to chromosomes via kinetochores, protein complexes assembled on the centromeres of each chromosome. Mitotic spindles differ in geometry, so simple species such as yeasts have rod-shaped, elongated spindles with a small number of microtubules and chromosomes, making them suitable for experimental research and simple enough to test theoretical models, while human cells have larger spindles with a large number of chromosomes. Experimental measurements have shown that there are microtubules between the kinetochores, whose role in cell division has not yet been investigated. Measurements have shown that these microtubules do not belong to the bundle of kinetochore microtubules, but they are stably bound to them, so we call them bridging microtubules, and in this thesis we developed physical models that clarify their role during stages of cell division.

In addition to kinetochore microtubules, bridging microtubules and kinetochores, the models include the interaction of microtubules with the poles of the mitotic spindle and passive and active molecular motors that laterally connect kinetochore and bridging microtubules and enable their sliding and active motors that regulate dynamics of the microtubule plus ends.

Dynamics of the kinetochores in the metaphase

In the first part of this thesis, we considered stochastic motions of kinetochores in yeast cells in metaphase. The model defined here together with experiments shows that kinesin-8 motors are required to center the kinetochore in the metaphase plate, while the dependence of the rescue rate on force is necessary to generate oscillations. Kinetochore centering is due to motor accumulation at the plus end of microtubules as a function of microtubule length, resulting in a more frequent catastrophe of longer microtubules and thus less frequent kinetochore movements outside the central third of mitotic spindle. In contrast to the simulations used so far that investigate kinetochore movements in the metaphase spindle of yeast and in human cells, in defining our model, Langevin's approach was used to describe the stochastic nature of the dynamic instability of microtubules. Previous models use Monte Carlo simulations to describe stochastic dynamics of

the plus ends of microtubules. Using the Langevin approach described here, we showed that kinetochores will move near the center of the metaphase plate for a wide range of parameters only if we describe the dynamics of the plus ends of microtubules using stochastic terms. In our system the observed robustness of the kinetochore movements suggests that our model provides a plausible explanation for how a biological system with large variability generates typical kinetochore movements around the metaphase plate.

Expansion of the model for kinetochore positioning in the metaphase for human spindles

As it has been found that positioning of the chromosomes in the equatorial plane of the mitotic spindle is necessary to prevent the existence of misaligned chromosomes which lead to abnormal nuclear envelope reformation, our minimal model for kinetochore movements in the metaphase spindle of a yeast cell is in this chapter extended. Here we include mechanisms generated by bridging microtubules, which are linked along lateral overlaps to kinetochore bundles by passive proteins, to theoretically investigate potential chromosome positioning mechanisms in more complicated, human spindles. In this case, the kinetochore fibers consist of 10 microtubules and now the Langevin noise effect is smaller and the shape of the oscillations is more regular, thus reproducing the metaphase movements of the kinetochores in human cells and positioning of the chromosome in the center of the mitotic spindle. The model presented here predicts that stable antiparallel overlaps of bridging microtubules guide the positioning of the kinetochores to the center of the metaphase plate and thus characterize an additional mechanism that, in addition to the currently known mechanism of kinesin-8 motors, ensures robust positioning of chromosomes within the mitotic spindle. The model also predicts that the kinetochores away from the center of the spindle will achieve a new stable position that correlates with the position of the bridging microtubules overlap.

Theoretical model for kinetochore separation in the anaphase

Theoretical work presented in this chapter focuses on chromosome separation during anaphase. We have shown that the pushing forces generated within the overlap of the bridging microtubules separate the chromosomes, independent of the connection with the poles of the mitotic spindle. This result is unexpected according to previous chromosome separation models, in which all

processes contributing to chromosome separation must be directly or indirectly related to the poles of the mitotic spindle. The experiments briefly presented in this paper show just the opposite, i.e. suggest that the forces necessary for the separation of genetic material must arise within the mitotic spindle itself, confirming the necessity of the bridging microtubule bundle and their adjacent molecular motors that will drive chromosome separation in anaphase. In addition to motor proteins, our theory includes passive protein bonds between bridging and kinetochore bundles; as potential candidates for this mechanism there are mesh proteins and as a passive link in the antiparallel part of the bundle there are PRC1 proteins as well as numerous active molecular motors in dynamic processes within the spindle. We have shown by theoretical modeling that lateral sliding between bridging and kinetochore microtubules generated by active motors located in the antiparallel microtubule bundles allows robust chromosome separation independent of forces generated at the spindle pole.

Conclusion

The work presented here shows how the forces generated by the links between kinetochore and hitherto unexplored bridging microtubules in combination with the forces at the dynamic plus ends of microtubules navigate the oscillatory movements of chromosomes during metaphase in yeast and human cells and the positioning and separation of chromosomes in human cells.

SADRŽAJ

1 Uvod 1

1.1 Stanična dioba i elementi diobenog vretena 2

1.2 Stohastički procesi u biofizici 8

1.3 Dinamički sustavi i bifurkacije 16

2 Dinamika kinetohora u metafazi 22

2.1 Eksperimenti u sustavu stanica kvasaca 24

2.2 Minimalni model 29

2.3 Izbor vrijednosti parametara 34

2.4 Rezultati modela za dinamiku kinetohora u metafazi 38

2.5 Utjecaj Langevinovog člana na parametarski prostor modela 39

3 Proširenje modela za pozicioniranje i kretanja kinetohora u metafazi za ljudske stanice 42

3.1 Premosni mikrotubuli u diobenom vretenu ljudskih stanica 42

3.2 Proširenje modela za pozicioniranje kinetohora 44

3.3 Izbor vrijednosti parametara 47

3.4 Kinetohore se pozicioniraju u odnosu na položaj snopa premosnih mikrotubula 49

4 Teorijski model za razdvajanje kinetohora u anafazi 51

4.1 Eksperimenti laserskog rezanja snopova premosnih vlakana 52

4.2 Minimalni model za razdvajanje kinetohora 54

4.3 Izbor vrijednosti parametara 57

4.4 Rezultati modela za razdvajanje kinetohora 59

5 Zaključak i diskusija 64

6 Literatura 66

7 Životopis i popis radova 76

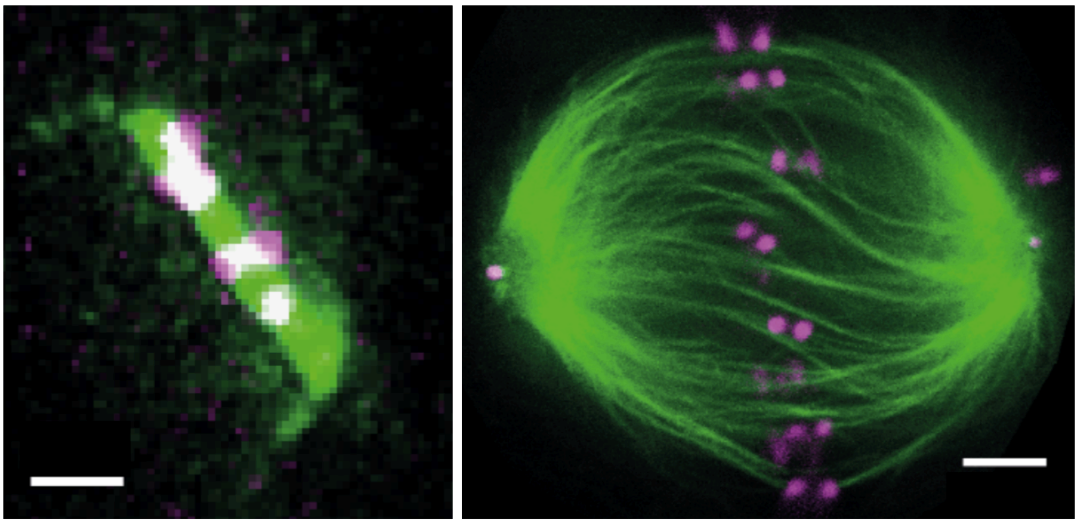
8 Životopis mentora 77

1 Uvod

U ovom radu opisana je funkcija svežnjeva mikrotubula i njima pripadajućih aktivnih i pasivnih motora tijekom stanične diobe. Svežnjevi mikrotubula važan su strukturni element diobenog vretena. Sile generirane unutar njih odgovorne su za dinamiku kromosoma tijekom centriranja u ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena te za separaciju kromosoma u posljednjim fazama diobe. U uvodnom dijelu opisana je struktura diobenog vretena, njegovi glavni sastavni elementi – kinetohore, mikrotubuli i vezivni proteini. Također, uvodimo matematički formalizam potreban za razumijevanje teorijskih rezultata opisanih u kasnijim poglavljima što uključuje teoriju stohastičkih diferencijalnih jednadžbi te linearnu analizu stabilnosti i bifurkacije. Veza sa statističkom fizikom i biofizikom dana je po uzoru na (Van Kampen, 1992), dok opis linearne analize stabilnosti i bifurkacija prati (Strogatz, 1994). Dodatna biofizička literatura od interesa (Howard, 2001). U daljnjim poglavljima opisana su eksperimentalna mjerenja koja motiviraju našu teoriju i koje kasnije uspoređujemo s predviđanjima teorijskih modela. Dani su modeli za dinamiku kinetohora i mikrotubula u metafazi i anafazi te njihovi rezultati. Ovdje opisani eksperimenti objavljeni su u (Vukušić *et al*., 2017; Klemm *et al*., 2018; Jagrić *et al.*, 2019). Konačno, u posljednjem poglavlju ukratko su sažeti najvažniji rezultati koji proizlaze iz predstavljenih modela te su smješteni u kontekst dosadašnjih istraživanja u području biofizike diobenog vretena.

1.1 Stanična dioba i elementi diobenog vretena

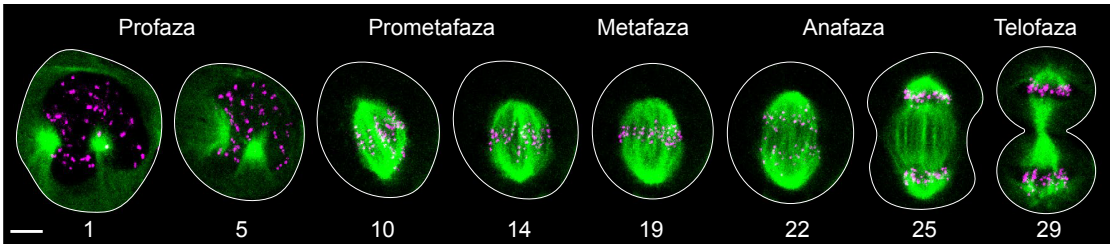
Stanična dioba fundametalan je proces u živom svijetu kojeg vodi diobeno vreteno, kompleksna stanična struktura sastavljena od mikrotubula i pripadajućih motornih i pasivnih proteina (McIntosh *et al*., 2012; Tolić and Pavin, 2016). Mikrotubuli u diobenom vretenu su povezani s kromosomima putem kinetohora, proteinskih kompleksa sastavljenih na centromerama svakog kromosoma. Diobena vretena razlikuju se u geometriji, tako jednostavne vrste poput kvasaca imaju štapićasta, izdužena vretena s malim brojem mikrotubula i kromosoma, što ih čini prikladnima za eksperimentalna istraživanja i dovoljno jednostavnima za testiranje teorijskih modela. Ljudske stanice imaju veća vretena s velikim brojem kromosoma te nekoliko tipova snopova mikrotubula koji sudjeluju u mehanizmima koji pokreću kromosome u vretenu (Slika 1.1.1).



Slika 1.1.1: *Primjeri diobenih vretena u kojima su zeleno označeni mikrotubuli, a magenta kinetohore. Lijevo, diobeno vreteno u stanici kvasca S. pombe. Skala duljine* $1\ \mu m$*. Desno, ljudska HeLa stanica. Skala duljine* $2\ \mu m$*. Snimljeno u Tolić labu, IRB.*

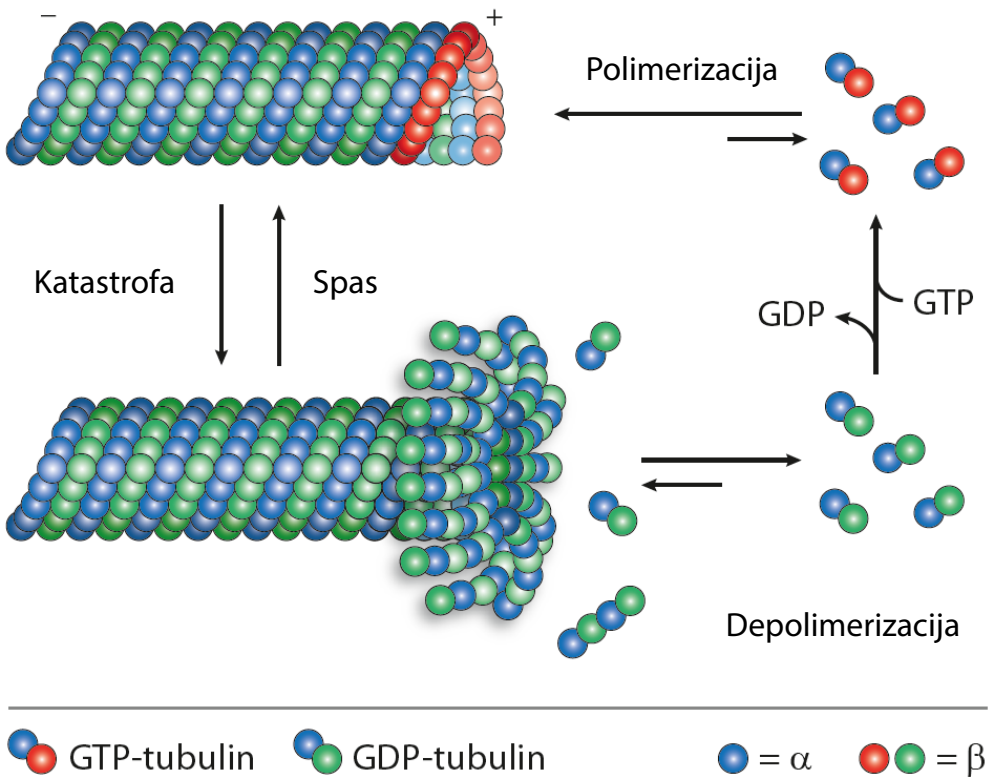
Tijekom stanične diobe, vreteno stanice proći će kroz ciklus od pet faza prije samog trenutka formiranja dviju identičnih stanica kćeri. Neposredno prije početka diobe stanica se nalazi u interfazi te se tada genetski materijal u jezgri stanice duplicira. Također, u interfazi se dupliciraju i polovi diobenog vretena. U ranoj profazi (Slika 1.1.2) stanica se priprema za diobu te sastavlja strukture potrebne u kasnijim fazama diobe, poput mikrotubula, te se tada genetski materijal

kondenzira u kromosome, kompaktniji format efikasniji prilikom same diobe. Također, jezgrina ovojnica koja je okupljala nekondenzirani genetski materijal se sada rastvara te se definiraju polovi diobenog vretena oko centrosoma. U prometafazi, vreteno započinje s prostornom organizacijom kromosoma, koji su sada veoma kompaktni i u potpunosti oslobođeni jezgrine ovojnice. Kako vreteno raste, formirani snopovi mikrotubula se vežu na kromosome putem kinetohora te takve snopove nazivamo kinetohornim snopovima mikrotubula (Musacchio and Desai, 2017). Snopovi mikrotubula koji se ne vežu na kromosome mogu se vezati na stanični korteks ili sačinjavaju snopove koji se isprepliću u središtu diobenog vretena, čime stabiliziraju diobeno vreteno tijekom diobe. Tijekom metafaze, svi kromosomi su povezani s pripadajućim snopom kinetohornih mikrotubula na suprotne polove vretena te pozicionirani u središtu diobenog vretena. Prije samog ulaska u anafazu, stanica će kemijskim signalnim putevima provjeriti jesu li svi kromosomi ispravno vezani za nasuprotne polove putem snopova mikrotubula. U slučaju da neki par kromosoma nije ispravno povezan ili orijentiran, ulazak u anafazu će biti odgođen. Kada stanica uđe u anafazu, proteinsko ljepilo između sestrinskih kromatida, kohezin će se razgraditi te će kromatide biti povučene prema nasuprotnim polovima putem mehanizama koje vodi dinamika mikrotubula i njima pripadajući motorni i pasivni proteini. U ovoj fazi polovi će se također razmaknuti zbog sila guranja generiranih pomoću snopova mikrotubula koji se isprepliću u središtu vretena. U posljednjoj fazi, telofazi, stanica je gotovo u potpunosti podijeljena (citokineza). Diobeno vreteno raspada se na osnovne proteinske dijelove te se formira nova jezgra u svakoj stanici kćeri. Kromosomi ponovno prelaze u dekondenziranu formu. Više o samoj staničnoj diobi može se pronaći u (Alberts *et al*., 1994), dok ćemo se u ovom radu baviti mehanizmima koji su odgovorni za gibanje kromosoma tijekom metafaze i anafaze.



Slika 1.1.2: *Mitoza u ljudskim U2OS stanicama. Mikrotubuli su prikazani u zelenoj, a kinetohore u magenta boji. Bijela linija označava granice stanice. Skala duljine je* 5 μm*, vrijeme je dano u minutama. Preuzeto iz (Tolić, 2017).*

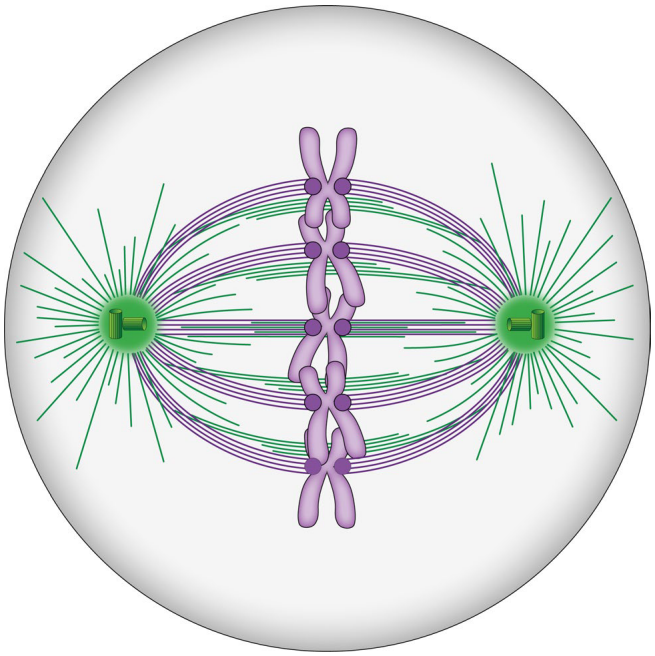
Mikrotubuli i njihovi snopovi. Mikrotubuli zajedno s aktinskim filamentima i intermedijalnim vlakanima se nazivaju stanični kostur, no glavnu ulogu u diobenom vretenu imaju mikrotubuli. Mikrotubuli su polimeri heterodimera tubulina, čije su podjedinice α i β-tubulini snažno međusobno vezani nekovalentnim vezama. (Slika 1.1.3) prikazuje cilindričnu geometriju mikrotubula, sastavljenih od 13 paralelnih protofilamenata koji čine šuplju cjevčicu. Svaka podjedinica protofilamenta je usmjerena u istom smjeru pa tako i konačni mikrotubul ima strukturnu i dinamičku polarnost. Kraj mikrotubula na kojem je β-tubulin zovemo minus krajem, dok kraj s α-tubulinom zovemo plus krajem. Mikrotubuli mogu rasti i skraćivati se na oba kraja, ali plus kraj mikrotubula ima jače izražena dinamička svojstva, tj. brže raste i skraćuje se te ima češće prijelaze između faza rasta i skraćivanja i obrnuto.



Slika 1.1.3: *Mikrotubuli i njihova dinamika. Preuzeto i prilagođeno s: https://www.nordicbiosite.com/news/microtubules-post-translational-modifications-of-tubulins-and-neurodegeneration. Hidroliza GTP-a se odvija samo na podjedinici β-tubulina. Nehidrolizirani dimer tubulina prikazan je crvenim krugom, a hidrolizirani zelenim krugom.*

Dinamička svojstva mikrotubula omogućuje kemijska energija koja proizlazi iz hidrolize molekule GTP-a, koja se odvija samo na podjedinici β-tubulina. Tako se rast, tj. polimerizacija mikrotubula, odvija ako podjedinice tubulina dođu na plus kraj prije nego započne hidroliza GTP-a. Do skraćivanja mikrotubula, tj. depolimerizacije, dolazi kada se učestalost spajanja podjedinica na plus kraj smanji te se u postojećim podjedinicama na plus kraju već dogodi hidroliza GTP-a u GDP. Skok iz faze rasta u fazu skraćivanja nazivamo katastrofom (engl. *catastrophe*), dok se obrnuti proces naziva spasom (engl. *rescue*). Više o dinamici mikrotubula može se pronaći u (Howard, 2001).

Tipično se mikrotubuli organiziraju u veće strukture, tj. snopove mikrotubula te se vežu za druge elemente diobenog vretena. Većina je mikrotubula vezana za polove diobenog vretena (McDonald *et al*., 1992). Mikrotubule koji iz polova rastu prema staničnom korteksu zovemo astralni mikrotubuli, one koji se vežu za sestrinske kinetohore i formiraju snopove nazivamo kinetohorni mikrotubuli, a one koji se se isprepliću u središtu diobenog vretena s nasuprotnim snopom i tvore antiparalelni snop, nazivamo interpolarni mikrotubuli (Ding *et al*., 1993). Mikrotubuli koji rastu iz istog pola u istom smjeru mogu tvoriti paralelne snopove te ih tada također mogu povezivati motorni i pasivni proteini. Kako je pokazano da su interpolarni i kinetohorni snopovi mikrotubula u ljudskim stanicama povezani duž svojih paralelnih i antiparalelnih preklopa te da takav spoj pomaže uravnotežiti tenziju na kromosomima tijekom metafaze (Kajtez *et al.*, 2016; Polak *et al*., 2017), u ovoj tezi fokusirat ćemo se na mehanizme gibanja kromosoma koje uzrokuju sile generirane putem kinetohornih snopova mikrotubula i na njih vezanih, premosnih snopova mikrotubula (Slika 1.1.4).

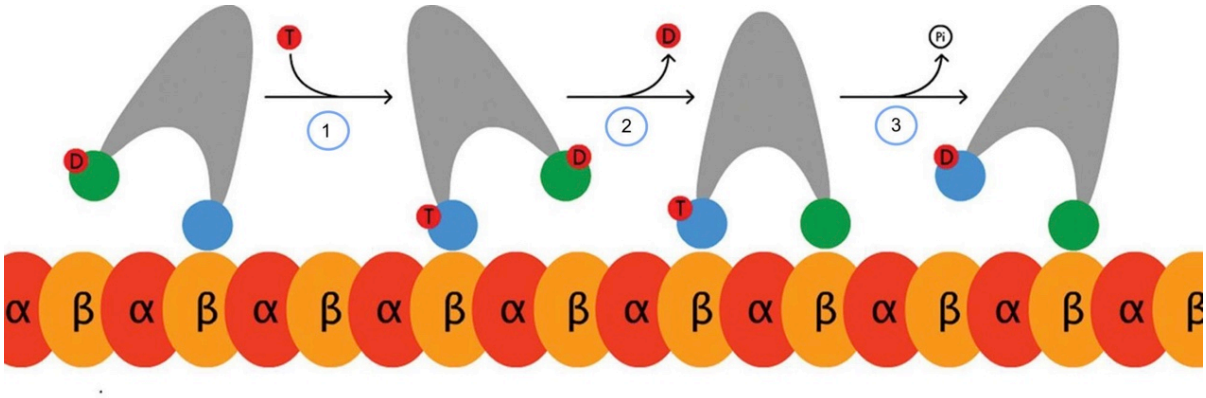


Slika 1.1.4: *Shema diobenog vretena. Kinetohorni mikrotubuli označeni su ljubičasto, a premosni zeleno. Astralni mikrotubuli rastu iz polova vretena prema korteksu stanice. Preuzeto iz (Tolić, 2017).*

Motorni i pasivni proteini. Mikrotubule unutar snopa povezuju motorni i pasivni proteini, koji se razlikuju u načinu kretanja duž mikrotubula. Pasivni proteini se duž mikrotubula kreću difuzno. Primjer pasivnih proteina koji će se sresti u našem sustavu je PRC1 u ljudskim stanicama i njegov analog u stanicama kvasaca, Ase1 (Hagen and Yanagida, 1990). Motorni proteini kreću se usmjereno uz potrošnju energije dobivene hidrolizom ATP-a (Howard, 2001), prema plus kraju mikrotubula (kinezin-5, Eg5) ili prema minus kraju mikrotubula (kinezin-14, Ncd). Motorni proteini mogu prenositi druge stanične strukture ili hodanjem između mikrotubula koje povezuju uzrokovati lateralno klizanje mikrotubula u vretenu. Također, postoje motori koji svojom akumulacijom na plus (kinezin-8, Kif18A), ili minus kraju (kinezin-13, KIF2A) mogu povećati učestalost katastrofe mikrotubula.

(Slika 1.1.5) shematski prikazuje pretvorbu energije u mehanički rad za kinezine i dineine. U jednostavnoj shemi, važna je kemijska reakcija hidrolize ATP molekule na ADP i fosfatnu skupinu označenu s P: ATP → ADP + P. Prednja glava motora čvrsto je vezana za mikrotubul, dok stražnja slobodno difundira jer sadrži ADP koji smanjuje afinitet prema mikrotubulu. Iako je gibanje stražnje glave nasumično, vjerojatnost vezanja ispred i iza učvršćene

glave nije ista, jer se energija sadržana u molekuli ATP-a koristi za promjenu konformacije cijelog motora, tako da se centar mase cijelog motora pomiče unaprijed. Ispuštanjem ADP molekule povećava se afinitet vezanja stražnje glave za mikrotubul pa ona ostaje vezana. Hidrolizom se ATP pretvara u ADP uz oslobađanje fosfatne skupine te se konformacija motora vraća na početnu. Iako su koraci mali, ovakav mehanizam koračanja, pri kojem se samo jedna glava motora odvaja s mikrotubula te omogućava motorima da prođu nekoliko stotina nanometara bez da se obje glave odvoje od mikrotubula čak i kada teret vrši veliku silu na motor, nazivamo procesivnošću. U slučaju da je motor pod opterećenjem, treba više energije za koračanje te je gibanje tada sporije. Ovisnost sile opterećenja i prosječne brzine gibanja motora je linearna (Svoboda and Block, 1994) te modelirana teorijski (Kolomeisky and Fischer, 2007).



Slika 1.1.5: *Motorni proteini prilikom koračanja duž mikrotubula. (1-2) ATP molekula veže se za glavu motora koja je vezana za mikrotubul te se time mijenja konformacija motora, tj. korača unaprijed. (2-3) Slobodna glava veže se na mikrotubul. (3-1) Hidrolizom ATP u ADP stražnja glava gubi afinitet za mikrotubul te se odvezuje. Preuzeto i prilagođeno s: https://en.wikipedia.org/wiki/Kinesin.*

Pasivni proteini također se mogu gibati po mikrotubulima. Njihovo pomicanje je, kao i kod motora, uzrokovano nasumičnim odvezivanjem glava proteina.

Međutim, u tom procesu ne dolazi do hidrolize ATP-a i ne mijenja se konformacija proteina pa je njima vjerojatnost pomaka u jednu i drugu stranu jednaka, a njihovo gibanje opisujemo kao 1D Brownovo gibanje. Iako difuzno gibanje nema preferirani smjer, u slučaju kad oni povezuju dva mikrotubula, koji su konačnih duljina, pasivni proteini mogu stvoriti entropijske sile na sličan način kao idealni plin u zatvorenoj posudi (Lansky *et al*., 2015).

1.2 Stohastički procesi u biofizici

Teorijski pregled stohastočkih procesa u biofizici preuzet je iz (Sunko, 2011; Kittel, 1958; Van Kampen, 1992). Pri izučavanju bioloških sustava znanstvenicima je često potrebno poznavanje parametara koji opisuju svojstva određenih plinova ili tekućina te ponašanje čestica koje mogu biti u njima raspršene. Promatranjem čestica raspršenih u plinovima ili tekućinama uočeno je da one doživljavaju niz uzastopnih sudara (njih 10^{14} u sekundi) s molekulama koje sačinjavaju medij. Kao rezultat takvih nasumičnih sudara raspršene čestice gibaju se medijem na potpuno nasumičan način. Mnoštvo kratkih impulsa koje izmjenjuju prilikom sudara međusobno je potpuno nekorelirano te je tako nemoguće promatrati dinamiku svake čestice zasebno. Međutim, takvo nasumično gibanje čestica, koje nazivamo *Brownovim gibanjem*, može biti modelirano te mnogi njegovi parametri mogu biti eksperimentalno mjereni (promatranjem čestica pod optičkim mikroskopom ili mjerenjem difuzije, FRAP-om (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*), neelastičnim Rayleighjevim raspršenjem).

Jednodimenzionalni nasumični šetač. Nasumično gibanje čestica koje doživljavaju niz nekoreliranih sudara s molekulama medija modeliramo pomoću gibanja tzv. *nasumičnog šetača,* zbog jednostavnosti najprije u jednoj dimenziji.

Zamislimo da netko hoda duž puta tako da prije svakog koraka bacanjem novčića donosi odluku hoće li sljedeći korak napraviti naprijed ili natrag. Očito, za takvog šetača ne možemo točno predvidjeti gdje će se nalaziti nakon *t* koraka pa, ako želimo opisivati njegovo gibanje, moramo pribjeći statističkom opisu. Za početak, zanima nas kolika je vjerojatnost da će se šetač naći na udaljenosti $x = x_1$ nakon *t* koraka ako se na početku nalazio na položaju $x = x_0$. Uz pojednostavljenje da su svi koraci iste duljine, možemo sastaviti konstrukciju danu u Tablici 1.1.

Tablica 1.1: *Konstrukcija gibanja nasumičnog šetača.*

Korak	Koordinata šetača	Norma

	-3	-2	-1	0	1	2	3	
0.	.	.	.	1	.	.	.	1
1.	.	.	1	.	1	.	.	1/2
2.	.	1	.	2	.	1	.	1/4
3.	1	.	3	.	3	.	1	1/8

Na početku, šetač se nalazi u ishodištu. Kad napravi prvi korak, može se naći samo na jednom od dva mjesta, lijevo ili desno od ishodišta, s jednakom vjerojatnošću $1/2$. U idućem koraku, naći će se na jednoj od parnih koordinata $x = -2, 0, 2$, ali je vjerojatnost nalaženja na koordinati 0 veća jer je na nju mogao doći iz oba prethodna položaja, $x = -1, 1$. Sada proizlazi da je vjerojatnost nalaženja šetača u nekoj točki jednaka zbroju vjerojatnosti nalaženja u dvije susjedne točke u prethodnom koraku, podijeljenom s dva (1.2.1).

$$P(x, t+1 \,|x_0, t_0) = \frac{1}{2}\,[P(x-1, t \,|x_0, t_0) + P(x+1, t \,|x_0, t_0)] \qquad (1.2.1)$$

Iz Tablice 1.1 možemo lako pogoditi rješenje rekurzije ako primijetimo da se u njoj pojavljuju binomni koeficijenti. Doista, ova rekurzivna konstrukcija upravo je poznati *Pascalov trokut*. Dakle, vjerojatnosti nalaženja šetača dane su binomnom raspodjelom:

$$P(x_1, t_1 \,|x_0, t_0) = \frac{1}{2^{t_1 - t_0}} \binom{t_1 - t_0}{(x_1 - x_0 + t_1 - t_0)/2}. \qquad (1.2.2)$$

Nakon *zadanog* broja koraka $t_1 - t_0 = t$, zanima nas kolika je očekivana vrijednost pomaka šetača, $\overline{x_1 - x_0}$, no ona je očito nula jer je raspodjela simetrična. Više informacija dobivamo ako promotrimo izraz (1.2.3) za srednje kvadratno odstupanje,

$$\overline{(x_1 - x_0)^2} = \frac{1}{2^t} \sum_x x^2 \binom{t}{(x+t)/2}. \qquad (1.2.3)$$

Ako se provede eksplicitno račun za parna mjesta, $t = 2k$ i $x = 2m$, imamo:

$$\sum_m m^2 \binom{2k}{m+k} = \left[\left(2 + s + \frac{1}{s}\right)^k\right]''_{s=1} = 4^{k-1} \cdot 2k. \qquad (1.2.4)$$

Za račun u izrazu (1.2.4) koristili smo funkciju izvodnicu (1.2.5).

$$\sum_m s^m \binom{2k}{m+k} = \left[\left(2 + s + \frac{1}{s}\right)^k\right] \qquad (1.2.5)$$

Konačno, dobivamo:

$$\overline{(x_1 - x_0)^2} = t_1 - t_0. \tag{1.2.6}$$

Iz izraza (1.2.6) vidimo da je linearni pomak šetača proporcionalan drugom korijenu vremena, a ne vremenu kao kod deterministčkog gibanja.

Kontinualna granica. Ako vremenski intervali postaju sve manji, kao i dužina koraka, onda očekujemo da će binomna raspodjela prijeći u Gaussovu. Zamijenimo, dakle, $t_1 - t_0 \rightarrow (t_1 - t_0)/\tau$ i $x_1 - x_0 \rightarrow (x_1 - x_0)/a$ te promatrajmo granicu $\tau \rightarrow 0$, $a \rightarrow 0$. Sada rekurziju (1.2.1) možemo zapisati kao:

$$\begin{aligned} P(x, t+1 \,|x_0, t_0) - P(x, t \,|x_0, t_0) \\ = \frac{1}{2}\,[P(x-1, t \,|x_0, t_0) + P(x+1, t \,|x_0, t_0) \\ - 2P(x, t \,|x_0, t_0)]. \end{aligned} \tag{1.2.7}$$

S prijelazom na dimenzionalne varijable i uvođenjem gustoće (1.2.8), izraz (1.2.7) prelazi u (1.2.9).

$$p(x,t) = P(x/a, t/\tau \mid x_0/a, t_0/\tau)/a \tag{1.2.8}$$

$$p(x, t+\tau) - p(x,t) = \frac{1}{2}\,[p(x-a,t) + p(x+a,t) - 2p(x,t)] \tag{1.2.9}$$

Ako a i τ nezavisno teže nuli, obje strane iščezavaju. No, primijetimo da lijevo imamo prvu derivaciju u *t*, a desno drugu derivaciju u *x*; dakle ako oni teže nuli, tako da omjer $a^2/2\tau = \alpha^2$ ostaje konstantan, izraz (1.2.9) možemo pisati u obliku:

$$\frac{p(x, t+\tau) - p(x,t)}{\tau} = \alpha^2 \cdot \frac{p(x-a,t) + p(x+a,t) - 2p(x,t)}{a^2}. \tag{1.2.10}$$

Odnosno:

$$\frac{\partial p(x,t)}{\partial \tau} = \alpha^2 \cdot \frac{\partial^2 p(x,t)}{\partial x^2}. \tag{1.2.11}$$

Izraz (1.2.11) nazivamo jednadžbom difuzije, s konstantom difuzije α^2. Nju, prema tome, možemo promatrati kao kontinualnu granicu rekurzije za binomne koeficijente. Njeno rješenje je

Gaussian:

$$p(x,t\,|x_0,t_0) = \frac{1}{\sqrt{4\pi\alpha^2(t-t_0)}}exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{4\alpha^2(t-t_0)}\right). \qquad (1.2.12)$$

Gaussian je normiran i zadovoljava početni uvjet, da je šetač u x_0:

$$\int dx\; p(x,t\,|x_0,t_0) = 1 \qquad (1.2.13)$$

$$\lim_{t_1\to t_0} p(x_1,t_1\,|x_0,t_0) = \delta(x_1-x_0). \qquad (1.2.14)$$

Također, on zadovoljava i jedan manje trivijalan uvjet (koji je očekivan ako ga interpretiramo kao uvjetnu vjerojatnost): naime, u nekom trenutku t' između t_0 i t_1, šetač je sigurno bio negdje:

$$\int dx'\; p(x_1,t_1\,|x',t')p(x',t'\,|x_0,t_0) = p(x_1,t_1\,|x_0,t_0), (t_0 < t' < t_1). \qquad (1.2.15)$$

Izraz (1.2.15) nazivamo *jednadžbom Smoluchowskog*. Zapravo ne možemo unaprijed tvrditi da se pri ovakvoj konstrukciji vjerojatnosti $p(x_1,t_1\,|x_0,t_0)$ pod integralom neće pojaviti neka integralna jezgra koja ovisi o x' i t'. Njezino odsustvo u jednadžbi Smoluchowskoga je direktna posljedica nezavisnosti šetačeve odluke: odluka o tome koji će mu biti idući korak bit će nezavisna o njegovim prethodnim odlukama. Položaj šetača u trenutku $t+\tau$ dakle ovisi samo o tome koji mu je položaj bio u trenutku *t*, a ne i o tome kako je tamo dospio. Procesi u kojima vrijednost nasumične varijable x_{n+1} ovisi samo o x_n, a ne o *n,* ili drugim vrijednostima x_i, zovu se *Markovljevi procesi*. Za njih vrijedi jednadžba Smoluchowskog.

Važno je uočiti da diskretni model nasumičnog šetača općenito *nema* kontinualnu granicu, nego samo za jedno određeno, kritično skaliranje vremenskih i prostornih odsječaka, takvo da je a^2/τ konstanta. Fizikalno rečeno, općenito ne možemo očekivati da nećemo imati ovisnost o 'mikroskopskoj' rešetci, na kojoj je definiran neki model; no ponekad postoje specijalne, kritične vrijednosti parametara u kojima ponašanje modela prestane ovisiti o mikroskopskim skalama.

Gibanje Brownove čestice. Sada ćemo vidjeti kako se rezultati analiza nasumičnog šetača pojavljuju u fizikalnom kontekstu. Promatramo malu česticu suspendiranu u tekućini. Njezina

jednadžba gibanja je:

$$M\dot{v} = K(t). \tag{1.2.16}$$

U izrazu (1.2.16) *K(t)* predstavlja sumu nasumične sile koja potječe od udaraca koje čestica prima od molekula tekućine i viskoznog otpora:

$$K(t) = -\mu v + MA(t), \tag{1.2.17}$$

gdje je *A(t)* nasumični dio sile, koji ima vremenski prosjek nula. Kad čestica miruje, ovaj dio je sve što ostaje od sile *K(t)*. Jednadžba gibanja dana s (1.2.18) naziva se *Langevinovom jednadžbom*:

$$\dot{v} = -\frac{\mu}{M}v + A(t). \tag{1.2.18}$$

Sljedeće želimo pronaći vremensku evoluciju koordinate *x(t)*. Iz analiza nasumičnog šetača znamo da će prosjek $\overline{x(t)}$ iščezavati. Zato preuredimo jednadžbu gibanja tako da nađemo evoluciju prosjeka kvadrata $\overline{x^2(t)}$. Prvo, jednadžbu gibanja (1.2.18) množimo s *x* te, uz $x\dot{x} = \frac{1}{2}\frac{d}{dt}x^2$ i $x\ddot{x} = \frac{1}{2}\frac{d^2}{dt^2}x^2 - (\dot{x})^2$ izraz (1.2.18) prelazi u:

$$\frac{1}{2}\frac{d^2}{dt^2}x^2 - (\dot{x})^2 = -\frac{\mu}{2M}\frac{d}{dt}x^2 + xA(t). \tag{1.2.19}$$

Vremenski prosjek $\overline{x(t)A(t)}$ iščezava jer položaj čestice nije koreliran sa stohastičkom silom, dok iz ekviparticionog teorema slijedi: $\overline{(\dot{x})^2} = \frac{kT}{M}$. Konačno, ako označimo vremenski prosjek derivacije x^2 s γ $\left(\gamma = \overline{\frac{d}{dt}x^2} = \frac{d}{dt}\overline{x^2}\right)$, jednadžba gibanja postaje:

$$\dot{\gamma} = \frac{2kT}{M} - \frac{\mu}{M}\gamma. \tag{1.2.20}$$

Asimptotsko rješenje ($t \to \infty$) je ono za koje je $\dot{\gamma} = 0 \to \gamma = \frac{2kT}{\mu}$ ili integriranjem, uz definiciju $\gamma = \frac{d}{dt}\overline{x^2}$,

$$\overline{x^2} = \frac{2kT}{\mu} t. \qquad (1.2.21)$$

Vidimo dakle da je prosječni *kvadrat* pomaka Brownove čestice proporcionalan vremenu, baš kao kod nasumičnog šetača. Nadalje, za sferičnu česticu možemo uvrstiti vezu koeficijenta μ i konstante viskoznosti η, tzv. *Stokesov zakon*: $\mu = 6\pi R\eta$ pa dobivamo:

$$\overline{x^2} = \frac{kT}{3\pi R\eta} t. \qquad (1.2.22)$$

Iz ove jednadžbe možemo odrediti Boltzmannovu konstantu *k*, ako izmjerimo veličinu Brownove čestice pod mikroskopom i uvrstimo poznatu konstantu viskoznosti. Alternativno, veličinu μ možemo odrediti eksperimentalno iz granične brzine pri konstantnoj vanjskoj sili K_0: $\bar{\dot{x}} = K_0/\mu$. Na taj je način po prvi put određen omjer plinske i Boltzmannove konstante, tj. Avogardov broj.

Iz rješenja jednadžbe difuzije (1.2.11) dobije se: $\overline{x^2} = \int x^2\, p(x,t) = 2\alpha^2 t$, tako da je konstanta difuzije:

$$\alpha^2 = kT \cdot \frac{1}{\mu}\ . \qquad (1.2.23)$$

Veličina $1/\mu$ se zove *mobilnost* čestice pa sada imamo direktnu vezu konstante difuzije i mobilnosti, dakle makroskopske i mikroskopske karakteristike gibanja Brownove čestice. Rezultat (1.2.23) zove se *Einsteinova relacija*.

Izraz $\overline{x^2} = 2\alpha^2 t$ ne vrijedi u granici $t \to 0$ jer vodi na beskonačne brzine. Sličan račun može se provesti uz dva nova uvjeta: konačne početne brzine i distribuciju finalnih brzina identičnu Maxwellovoj distribuciji. Za vremena $t \gg \beta^{-1},\ \beta \equiv \mu/m$, novi uvjeti ponovo daju Einstein-Langevin rješenje: $\overline{(x - x_0)^2} = (2k_B T/m\beta^2)\left(\beta t - 1 + e^{-\beta t}\right)$. Za vrlo kratka vremena ($t \to 0$) gibanje Brownove čestice jednako je gibanju slobodne čestice čija je $\overline{v^2} = k_B T$. U blizini $t = \tau$ odvija se prijelaz prema difuznim procesima, dok za $t \gg \tau$, $\overline{(x - x_0)^2}$ postaje proporcionalno t, a ne više t^2.

Primjer Master jednadžbe. Master jednadžbe su diferencijalne jednadžbe koje opisuju evoluciju vjerojatnosti za Markovljeve procese za sustave u kojima su dozvoljeni skokovi iz

jednog stanja u drugo u kontinuiranom vremenu. Ovdje ćemo dati primjer u kojem je broj dozvoljenih stanja diskretan, kao što je slučaj u primjerima kemijskih reakcija, širenja epidemija te u slučaju dinamike plus kraja mikrotubula čiji opis slijedi u ovom radu.

Primjer koji ovdje promatramo opisuje situaciju u kojoj se naš sustav može naći u dva stanja, na primjer, stanju "1" i "2". Općenito, takav sustav može modelirati situacije u kojoj stanje "1" može biti osoba kad je zdrava, a u stanje "2" prijeđe kada se razboli, ili radioaktivni atom u neraspadnutom stanju nosi oznaku "1", a u raspadnutom "2". U ovim i mnogim sličnim primjerima, prijelaze između dva stanja definiramo kao nasumične događaje koji se pojavljuju s određenim učestalostima. Tako definiramo $\omega(1 \to 2)$, učestalost s kojom sustav (osoba, čestica) prelazi iz stanja "1" u stanje "2" te pretpostavljamo da se ti prijelazi odvijaju nasumično i uniformno. To znači da postoji vjerojatnost $\omega(1 \to 2)dt$ da naš sustav prijeđe iz stanja "1" u "2" u intervalu vremena $(t, t + dt)$. Inverzan proces, tj. prijelaz iz "2" u "1" se može i ne mora dogoditi (na primjer, bolesna osoba može ozdraviti, ali jednom raspadnuti atom ne može se ponovno sastaviti).

Ako krenemo od nekog početnog vremena t_0, tražimo vjerojatnosti $P_1(t)$ i $P_2(t)$ da se čestica nađe u stanju "1" ili "2" u vremenu t. Za tražene vjerojatnosti mora vrijediti $P_1(t) + P_2(t) = 1$. Vjerojatnosti ćemo izračunati iz diferencijalnih jednadžbi koje opisuju njihovu vremenusku evoluciju, a zapisat ćemo ih tako da povežemo vjerojatnosti za dva vremena, t i $t + dt$. Na taj način, implicitno koristimo Markovljevu pretpostavku, jer učestalosti prijelaza iz jednog stanja u drugo tijekom vremenskog intervala $(t, t + dt)$ ne ovise o povijesti sustava, već samo o stanju u kojem se naš sustav nađe u vremenu t. Vjerojatnost $P_1(t + dt)$ da se čestica nađe u stanju "1" u vremenu $t + dt$ ima dva doprinosa: da se u vremenu t nalazi u stanju "1", $P_1(t)$ i ne prijeđe u stanje "2" tijekom intervala $(t, t + dt)$ te da se u vremenu t pronađe u stanju "2", $P_2(t)$ i u intervalu $(t, t + dt)$ prijeđe u stanje "1". Koristeći pravilo uvjetne vjerojatnosti dolazimo do (1.2.24),

$$P_1(t + dt) = P_1(t) \cdot [vjerojatnost\ da\ \check{c}estica\ ostane\ u\ 1] + P_2(t) \cdot [vjerojatnost\ da\ \check{c}estica\ skoči\ iz\ 2\ u\ 1] \tag{1.2.24}$$

Vjerojatnost prijelaza iz "2" u "1" u intervalu vremena $(t, t + dt)$ je $\omega(2 \to 1)dt$, dok je vjerojatnost s kojom čestica ostaje u stanju "1", $[1 - \omega(1 \to 2)dt]$,

$$P_1(t+dt) = P_1(t)[1-\omega(1\to 2)dt] + P_2(t)\omega(2\to 1)dt + O(dt^2). \quad (1.2.25)$$

Zanemareni su $O(dt^2)$ doprinosi, koji opisuju višestruke prijelaze. Na primjer, u slučaju da čestica bude u stanju "1" u vremenu $t+dt$ jer je bila u stanju "1" u vremenu t te je napravila dva prijelaza, prijelaz iz "1" u "2" i zatim iz "2" u "1" tijekom intervala $(t, t+dt)$. Takav događaj bi se pojavio s vjerojatnošću $\omega(1\to 2)dt\times\omega(2\to 1)dt = O(dt^2)$. Slični višestruki događaji se odvijaju s vjerojatnošću koja iščezava u granici $dt\to 0$. Ako nanovo zapišemo (1.2.25) uzimajući u obzir granicu $dt\to 0$ dobit ćemo diferencijalnu jednadžbu (1.2.26) te sličnim razmatranjem (1.2.27).

$$\frac{dP_1(t)}{dt} = -\omega(1\to 2)P_1(t) + \omega(2\to 1)P_2(t) \quad (1.2.26)$$

$$\frac{dP_2(t)}{dt} = \omega(1\to 2)P_1(t) - \omega(2\to 1)P_2(t) \quad (1.2.27)$$

Izrazi (1.2.26) i (1.2.27) su veoma jednostavni primjeri Master jednadžbi: jednadžbi za vjerojatnost da stohastički sustav koji može prelaziti između različitih stanja, u vremenu t bude u jednom u tih stanja. Ovdje prikazan primjer primijeniti ćemo na naš biološki sustav dinamičkih mikrotubula.

1.3 Dinamički sustavi i bifurkacije

Uvod u dinamičke sustave i bifurkacije preuzet je iz (Strogatz, 1994). Autonomne dinamičke sustave možemo analizirati na primjeru sustava običnih diferencijalnih jednadžbi. Zapis $\dot{x}_i$ predstavlja vremensku derivaciju, tj. $\dot{x}_i = \frac{dx_i}{dt}$. Varijable $x_1, \dots, x_n$ mogu označavati različite dinamičke veličine, npr. koncentracije kemikalija u kemijskim reakcijama, populacije različitih vrsta u ekosustavima ili položaje i brzine planeta u solarnom sustavu. Funkcije $f_1, \dots, f_n$ određene su problemom kojeg razmatramo. Rješenja sustava (1.3.1) možemo vizualizirati kao trajektorije u n-dimenzionalnom faznom prostoru (u mehaničkim sustavima fazni prostor razapinju sve komponente položaja i impulsa).

$$\begin{aligned} \dot{x_1} &= f_1(x_1, \dots, x_n) \\ &\vdots \\ \dot{x_n} &= f_n(x_1, \dots, x_n) \end{aligned} \tag{1.3.1}$$

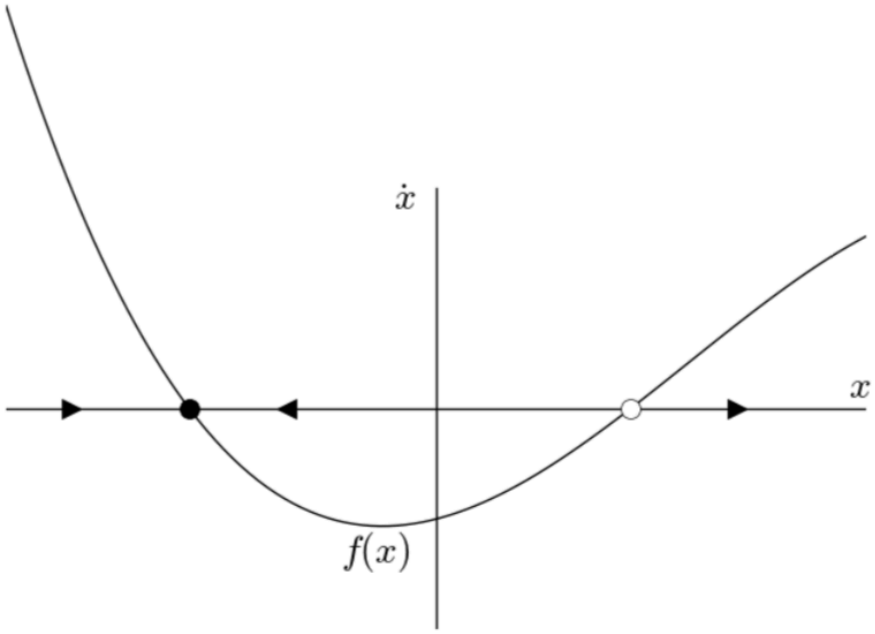
Jednodimenzionalni sustavi. Za početak, analizirat ćemo najjednostavniji slučaj $n = 1$, dan formom (1.3.2).

$$\dot{x} = f(x) \tag{1.3.2}$$

Ovdje je $x(t)$ realna funkcija ovisna o vremenu t, dok je $f(x)$ glatka realna funkcija od x koje ne ovisi eksplicitno o vremenu. Za bilo koji jednodimenzionalni sustav možemo skicirati graf funkcije $f(x)$ (Slika 1.3.1) te zatim skicirati vektorsko polje na realnoj osi (x os na (Slika 1.3.1)). Takvo vektorsko polje možemo interpretirati kao fazni fluid koji struji duž realne osi faznog prostora lokalnom brzinom $f(x)$. Tok je usmjeren na desno kada vrijedi $f(x) > 0$ i na lijevo za $f(x) < 0$.

Kako bismo pronašli rješenje jednadžbe $\dot{x} = f(x)$, počinjemo od položaja x_0 u kojem se zamišljena čestica, tj. fazna točka, nalazi u $t = 0$ te zatim promatramo njeno ponašanje u vremenu. Gibanje fazne točke duž x-osi opisano je funkcijom $x(t)$, koju nazivamo trajektorijom. Tako je funkcija $x(t)$ rješenje diferencijalne jednadžbe (1.3.2) s početnim uvjetom x_0. Prikaz koji sadrži sve kvalitativno različite trajektorije sustava nazivamo faznim portretom. Izgled faznog portreta ovisi o fiksnim točkama x^* koje su definirane s $f(x^*) = 0$, tj. one su ravnotežna rješenja izraza (1.3.2). (Slika 1.3.1) je primjer faznog portreta u kojem puna crna točka označava stabilnu fiksnu točku (lokalni tok se slijeva u stabilnu fiksnu točku), dok je bijela točka nestabilna (lokalni tok izvire iz nestabilne fiksne točke). Ravnoteža je definirana kao stabilna ako se sve male

perturbacije uguše u vremenu. Nestabilna ravnoteža predstavlja slučaj u kojem perturbacije rastu u vremenu.



Slika 1.3.1: *Fiksne točke i stabilnost u slučaju jednodimenzionalnog dinamičkog sustava. Crna točka označava stabilnu, dok bijela nestabilnu fiksnu točku. Smjer strelica označava smjer toka vektorskog polja. Preuzeto iz (Strogatz, 1994).*

Analiza linearne stabilnosti. Uz grafičke metode, za određivanje svojstava faznog toka najčešće se koristi kvantitativna mjera stabilnosti, poput brzine povratka u stabilnu fiksnu točku ili brzine udaljavanja od nestabilne fiksne točke. Takvu informaciju o sustavu dobivamo linearizacijom jednadžbi gibanja oko fiksne točke. Ako je x^* fiksna točka, tada je $\hat{x}(t) = x(t) - x^*$ mala perturbacija oko fiksne točke. Kako bismo provjerili da li perturbacija raste ili trne u vremenu, tražimo derivaciju,

$$\frac{d}{dt}\hat{x}(t) = \frac{d}{dt}(x - x^*) = \dot{x}. \tag{1.3.3}$$

Kako je u (1.3.3) x^* konstanta, slijedi $d\hat{x}(t)/dt = \dot{x} = f(x) = f(x^* + \hat{x})$. Taylorovim razvojem u red dobijemo (1.3.4), gdje $\mathcal{O}(\hat{x}^2)$ predstavlja kvadratične članove u $\hat{x}$ koje možemo zanemariti, dok je $f'(x) = \partial f/\partial x$. Dodatno, $f(x^*) = 0$ jer je x^* fiksna točka te tako dolazimo do (1.3.5).

$$f(x^* + \hat{x}) = f(x^*) + \hat{x}f'(x^*) + \mathcal{O}(\hat{x}^2) \tag{1.3.4}$$

$$\frac{d}{dt}\hat{x}(t) = \hat{x}f'(x^*) \tag{1.3.5}$$

Izraz (1.3.5) je linearna jednadžba u $\hat{x}$, dobivena linearizacijom oko fiksne točke. Ona pokazuje kako perturbacija $\hat{x}(t)$ raste eksponencijalno za $f'(x^*) > 0$ i eksponencijalno trne za $f'(x^*) < 0$. U slučaju $f'(x^*) = 0$, članovi $\mathcal{O}(\hat{x}^2)$ nisu zanemarivi te je potrebno provesti nelinearnu analizu da bismo ispitali stabilnost sustava. Iz linearne analize također saznajemo i brzinu atenuacije, tj. njezinu karakterističnu vremensku skalu danu s $1/|f'(x^*)|$. Za jednodimenzionalne sustave, iz linearne analize proizlazi da se sve trajektorije približavaju fiksnoj točki ili divergiraju prema $\pm\infty$ jer su prisiljene na monotoni rast ili pad prema ravnotežnom rješenju ili ostaju konstantne. Tako za jednodimenzionalne sustave nema periodičkih rješenja jer $\dot{x} = f(x)$ odgovara toku na liniji.

Bifurkacije. Uvođenjem ovisnosti sustava o parametrima, kvalitativna struktura toka može se promijeniti. Konkretno, variranjem parametara u sustavu možemo mijenjati postojanje i stabilnost fiksnih točaka sustava. Takve kvalitativne promjene u dinamici nazivamo bifurkacijama, a vrijednosti parametara za koje se takve promjene pojavljuju zovemo bifurkacijskim točkama.

Primjer trodimenzionalnih sustava. Nelinearni dinamički sustavi koji ovise o parametrima mogu pokazivati vrlo kompliciranа ponašanja u slučaju variranja nekog parametra. Kao i u jednodimenzionalnim sustavima, takve varijacije mogu uzrokovati pojavu ili nestajanje fiksnih točaka i u sustavima viših dimenzionalnosti, dok također u višim dimenzijama, varijacije parametara postaju uzrokom novih pojava poput nastanka ili nestanka periodičkih trajektorija ili drugih kompliciranijih formi. U analizu ovisnosti dinamičkog sustava o parametrima krećemo metodom analize linearne stabilnosti.

Promatramo neki općeniti sustav trećeg reda oblika (1.3.6) u kojem su f_1, f_2 i f_3 tipično nelinearne glatke funkcije od x, y i z.

$$\begin{aligned} \dot{x} &= f_1(x, y, z) \\ \dot{y} &= f_2(x, y, z) \\ \dot{z} &= f_3(x, y, z) \end{aligned} \tag{1.3.6}$$

Fiksne točke su vrijednosti (x^*, y^*, z^*) za koje je fazni tok stacionaran, tj. to su koordinate koje dobijemo kao rješenja sustava jednadžbi (1.3.7).

$$\begin{aligned} f_1(x^*, y^*, z^*) &= 0 \\ f_2(x^*, y^*, z^*) &= 0 \\ f_3(x^*, y^*, z^*) &= 0 \end{aligned} \tag{1.3.7}$$

Nakon pronalaska fiksnih točaka uvodimo male perturbacije (1.3.8). Da bismo izračunali kako perturbirana rješenja evoluiraju u vremenu, moramo ih supstituirati u originalne diferencijalne jednadžbe uzevši u obzir da derivacija fiksne točke iščezava u vremenu. Kada vratimo perturbirana rješenja u originalne diferencijalne jednadžbe, funkcije $f_1(x, y, z)$, $f_2(x, y, z)$ i $f_3(x, y, z)$ razvijemo do 1. reda u Taylorovom razvoju po perturbaciji i uvažimo činjenicu da je derivacija fiksne točke jednaka nuli. Tako dolazimo do skupa jednadžbi (1.3.9).

$$\begin{aligned} x(t) &= x^* + \hat{x}(t) \\ y(t) &= y^* + \hat{y}(t) \\ z(t) &= z^* + \hat{z}(t) \end{aligned} \tag{1.3.8}$$

$$\frac{d}{dt}\begin{pmatrix} \hat{x}(t) \\ \hat{y}(t) \\ \hat{z}(t) \end{pmatrix} = \left.\begin{pmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x} & \frac{\partial f_1}{\partial y} & \frac{\partial f_1}{\partial z} \\ \frac{\partial f_2}{\partial x} & \frac{\partial f_2}{\partial y} & \frac{\partial f_2}{\partial z} \\ \frac{\partial f_3}{\partial x} & \frac{\partial f_3}{\partial y} & \frac{\partial f_3}{\partial z} \end{pmatrix}\right|_{(x^*, y^*, z^*)} \begin{pmatrix} \hat{x}(t) \\ \hat{y}(t) \\ \hat{z}(t) \end{pmatrix} \tag{1.3.9}$$

U izrazu (1.3.9) 3×3 matricu izvrijednjenu u fiksnoj točki nazivamo Jacobijanom linearne transformacije. Za dani skup parametara svi elementi Jacobijana su konstante te u tom slučaju skup diferencijalnih jednadžbi (1.3.9) postaje linearni sustav diferencijalnih jednadžbi, čije je rješenje dano u obliku (1.3.10).

$$\begin{pmatrix} \hat{x}(t) \\ \hat{y}(t) \\ \hat{z}(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \hat{x}^{(1)} \\ \hat{y}^{(1)} \\ \hat{z}^{(1)} \end{pmatrix} e^{\lambda_1 t} + \begin{pmatrix} \hat{x}^{(2)} \\ \hat{y}^{(2)} \\ \hat{z}^{(2)} \end{pmatrix} e^{\lambda_2 t} + \begin{pmatrix} \hat{x}^{(3)} \\ \hat{y}^{(3)} \\ \hat{z}^{(3)} \end{pmatrix} e^{\lambda_3 t} \tag{1.3.10}$$

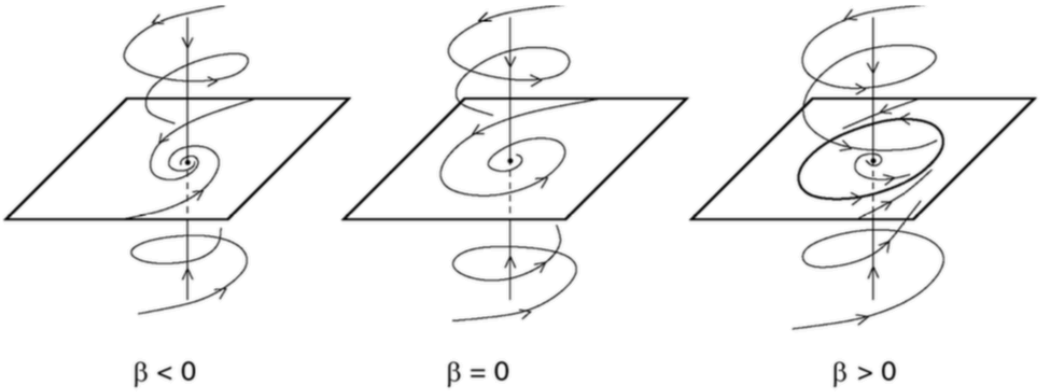
U izrazu (1.3.10), λ_1, λ_2 i λ_3 su kompleksne svojstvene vrijednosti Jacobijana, a pripadajući vektori $\left(\hat{x}^{(i)}, \hat{y}^{(i)}, \hat{z}^{(i)}\right)$ su odgovarajući svojstveni vektori Jacobijana. Proizlazi da općenito rješenje sustava (1.3.9) može biti eksplicitno zapisano pronalaskom svojstvenih vrijednosti i svojstvenih vektora Jacobijana. Ovakva analiza nam omogućava da istražimo stabilnost fiksne točke i karakter faznog toka oko nje. Iz oblika rješenja (1.3.10) proizlazi da iznos svojstvenih vrijednosti direktno utječe na dinamiku sustava. Na primjer, u slučaju da neka od svojstvenih vrijednosti ima pozitivan realni dio, tada iz izraza (1.3.10) proizlazi da će perturbacija rasti s vremenom, tj. fiksna točka će biti nestabilna. Svojstvene vrijednosti općenito ovise o

parametrima sustava te variranjem parametara mijenjamo iznos svojstvenih vrijednosti i time utječemo na promjenu stabilnosti fiksnih točaka i karakter rješenja. Promjena u broju i stabilnosti fiksnih točaka i pojava eventualnih zatvorenih periodičkih orbita, traži uvođenje bifurkacijske analize.

Hopfova bifurkacija. Za dimenzije $n \geq 2$, dolazi do pojave ili nestajanja periodičnih orbita promjenom stabilnosti fiksne točke tijekom varijacije parametara koju nazivamo Hopfovom bifurkacijom (Marsden, 1976). Najjednostavnija Hopfova bifurkacija je lokalna bifurkacija u kojoj fiksna točka dinamičkog sustava gubi stabilnost kako par kompleksno konjugiranih svojstvenih vrijednosti, dobivenih linearizacijom sustava jednadžbi oko fiksne točke, prelazi imaginarnu os u kompleksnoj ravnini. Tada možemo očekivati pojavu graničnog kola (engl. *limit cycle*), zatvorene periodične trajektorije u faznom portretu nelinearnih sustava, koja se formira oko fiksne točke. Drugim riječima, lokalnim promjena u svojstvima stabilnosti fiksne točke, uzrokovane varijacijama parametara sustava, dolazi do pojave ili nestajanja stabilnih ili nestabilnih periodičnih orbita. Kako bi došlo do pojave Hopfove bifurkacije, nužno je da sve svojstvene vrijednosti imaju negativni realni dio, osim para čisto kompleksno konjugiranih svojstvenih vrijednosti. Za slučaj trodimenzionalnih sustava tada vrijedi: $\lambda_{1,2} = \pm i\omega_0$, uz $\omega_0 > 0$ i $\lambda_3 < 0$, pri čemu je tada ω_0 frekvencija periodičkog gibanja sustava duž graničnog kola. Normalna forma Hopfove bifurkacije za trodimenzionalne sustave je dana s (1.3.11) te može biti nadkritična i podkritična.

$$\begin{aligned} \dot{x} &= \beta x - y + \sigma x(x^2 + y^2) \\ \dot{y} &= x + \beta y + \sigma y(x^2 + y^2) \\ \dot{z} &= -z \end{aligned} \tag{1.3.11}$$

U slučaju Hopfove bifurkacije, nadkritičnost ili podkritičnost određujemo iz koeficijenta σ koji predstavlja predznak prvog Lyapunovljevog koeficijenta $l_1(0)$ za dinamički sustav u blizini fiksne točke. Za $\sigma = -1$ Hopfova bifurkacija je nadkritična te normalna forma (1.3.11) ima fiksnu točku u ishodištu koordinatnog sustava koja je asimptotski stabilna za $\beta \leq 0$ te nestabilna za $\beta > 0$. Pojavljuje se jedinstveno stabilno granično kolo (engl. *limit cycle*) za $\beta > 0$ koje ima radijus $\sqrt{\beta}$, (Slika 1.3.2). Granično kolo je izolirana zatvorena trajektorija koja se pojavljuje u faznom portretu disipativnih nelinearnih sustava.



Slika 1.3.2: *Nadkritična Hopfova bifurkacija u sustavu s trodimenzionalnim faznim prostorom. Promjenom vrijednosti parametra β mijenja se stabilnost fiksne točke te dolazi do pojave jedinstvenog stabilnog graničnog kola. Preuzeto i prilagođeno s http://www.scholarpedia.org/article/Andronov-Hopf_bifurcation.*

Za slučaj $\sigma = +1$ Hopfovu bifurkaciju nazivamo podkritičnom te je tada ishodište koordinatnog sustava asimptotski stabilno za $\beta < 0$ i nestabilno za $\beta > 0$. U slučaju $\beta < 0$ uz stabilnu fiksnu točku u ishodištu, postoji i stabilno granično kolo, dok između njih leži nestabilno granično kolo prikazano kao isprekidana kružnica. S povećanjem β nestabilno granično kolo se steže oko fiksne točke, dok ona u $\beta = 0$ ne postane nestabilna. Za $\beta > 0$ postoji granično kolo velike amplitude te su tada rješenja koja su se nalazila u blizini ishodišta prisiljena rasti u oscilacije velikih amplituda. U slučaju podkritične bifurkacije sustav pokazuje histerezu jer jednom kada oscilacije velikih amplituda započnu nije ih moguće ugušiti vraćanjem parametra β na nulu. Više informacija o teoriji dinamičkih sustava i kaosu može se pronaći u (Strogatz, 1994; Kuznetsov, 1998). Analiza stabilnosti i Hopfove bifurkacije bit će primijenjena u idućem poglavlju.

2 Dinamika kinetohora u metafazi

Poglavlje 2 prikazuje rezultate rada (Klemm *et al.*, 2018). Tijekom mitoze, kako bi se ostvarila ispravna podjela genetskog materijala sestrinske kromatide svakog kromosoma moraju biti spojene na mikrotubule koji se protežu s nasuprotnih polova diobenog vretena putem kinetohora, proteinskih kompleksa na kromosomu (Cheeseman and Desai, 2008). Takav ispravan spoj para kinetohora, nazvan biorijentiranim, zatim oscilira u ekvatorijalnoj ravnini diobenog vretena (Skibbens *et al.,* 1993). Tijekom oscilacija kinetohore su pod tenzijom (Nicklas, 1988; Waters *et al.,* 1996; Dumont *et al.,* 2012). Oscilacije kinetohora opažene su u stanicama raznih organizama, uključujući kvasce, vodozemce i sisavce (Wise *et al.,* 1991; Skibbens *et al.,* 1993; Nabeshima *et al.,* 1998).

U stanicama kvasaca *Schizosaccharomyces pombe*, diobeno vreteno se u prometafazi sastoji od približno 20 mikrotubula koji se protežu od svakog pola diobenog vretena (engl. *spindle pole body*, ekvivalent centrosomima u kvascima) te svaka kinetohora interagira s 2-4 mikrotubula (Ding *et al.,* 1993). U ovoj se fazi sestrinske kinetohore gibaju oko središta diobenog vretena, do anafaze u kojoj su podijeljene prema suprotnim polovima (Funabiki *et al.,* 1993). Gibanja kinetohora u anafazi očituju se u stohastičkim gibanjima duž diobenog vretena (Nabeshima *et al.,* 1998) te su manje pravilna od gibanja kinetohora u stanicama kralježnjaka (Skibbens *et al.,* 1993).

Oscilacije kinetohora reguliraju motori kinezina-8 i u kvascima (Garcia *et al.,* 2002; West *et al.,* 2002; Mary *et al.,* 2015; Gergely *et al.,* 2016) i u ljudskim stanicama (Mayr *et al.,* 2007; Gardner *et al.,* 2008; Stumpff *et al.,* 2008; Hafner *et al.,* 2014). Deplecija kinezina-8 vodi na oscilacije velikih amplituda, što sugerira da kinezin-8 potiče kongresiju kromosoma u metafaznu ravninu. Stanice kvasca posjeduju dva homologa kinezina-8, Klp5 i Klp6, koja tvore heterodimer (West *et al.,* 2001). Brisanje jednog ili oba motora narušava dinamiku mikrotubula na isti način (West *et al.,* 2001, 2002; Garcia *et al.,* 2002; Unsworth *et al.,* 2008; Tischer *et al.,* 2009), no i dalje se mogu prepoznati mitotski defekti specifični za brisanje pojedinog proteina (Gergely *et al.,* 2016). Uz kinezin-8 i drugi motorni proteini utječu na oscilacije kinetohora. Na primjer, inaktivacija motornog proteina kinezina-5, Kif11/Eg5 vodi na nepravilne oscilacije s malom amplitudom (Vladimirou *et al.,* 2013). Kromokinezini (Levesque and Compton, 2001; Stumpff *et al.,* 2012; Wandke *et al.,* 2012), član obitelji XMAP215, TOGp (Cassimeris *et al.,* 2009),

centromerni protein CENP-H (Amaro *et al.,* 2010) i MCAK, kinezin koji depolimerizira mikrotubule (Jaqaman *et al.,* 2010) također su potrebni za pravilne oscilacije kromosoma.

Gibanja kinetohora u vretenu zahtijevaju postojanje sila. Kinetohore su povezane za plus kraj mikrotubula te tako ovise o dinamici plus kraja (Gachet *et al.,* 2008) koja uključuje rast i skraćivanje mikrotubula te prijelaze iz rasta u skraćivanje i obrnuto, tj. katastrofu i spas. Skraćujući mikrotubuli mogu generirati sile povlačenja na kinetohore (Grishchuk *et al.,* 2005), koje stabiliziraju spojeve kinetohore na mikrotubul (Li and Nicklas, 1995; Akiyoshi *et al.,* 2010). Kada na skraćujući mikrotubul djeluju sile povlačenja, njegova brzina skraćivanja se smanjuje, suprotno od brzine rastućeg mikrotubula, čija se brzina rasta povećava (Akiyoshi *et al.,* 2010; Volkov *et al.,* 2013). Rastući mikrotubuli generiraju sile guranja kada rastu u prepreku što rezultira smanjenjem brzine rasta (Dogterom and Yurke, 1997).

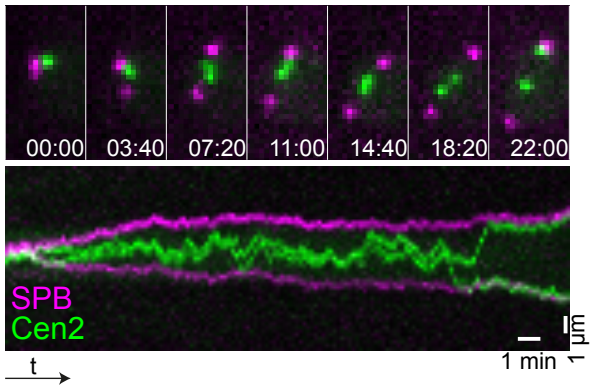
Dinamika mikrotubula regulirana je pomoću motornih proteina. Pokazano je da se motori kinezina-8 akumuliraju na plus kraju mikrotubula u ovisnosti o duljini mikrotubula te na taj način povećavaju učestalost katastrofe i skraćivanje mikrotubula *in vitro* i *in vivo* (Gupta *et al.,* 2006; Varga *et al.,* 2006; Mayr *et al.,* 2007; Grissom *et al.,* 2008; Tischer *et al.,* 2009; Erent *et al.,* 2012; Leduc *et al.,* 2012). Utjecaj motornih proteina na dinamiku mikrotubula istraživan je teorijski (Hough *et al.,* 2009; Varga *et al.,* 2009; Tischer *et al.,* 2010; Reese *et al.,* 2011; Johann *et al.,* 2012; Leduc *et al.,* 2012; Melbinger *et al.,* 2012). Akumulacija motora kinezina-8 ovisna o duljini mikrotubula i regulacija učestalosti katastrofe dominantni je mehanizam centriranja jezgre stanica u interfazi (Tolić-Norrelykke, 2010; Glunčić *et al.,* 2015) te je time vjerojatno važan mehanizam za centriranje kinetohora u diobenom vretenu.

Mehanizam oscilacija kinetohora i centriranje istraživani su u nekoliko teorijskih studija. Rani model za oscilacije u višim eukariotskim stanicama baziran je na vezanju i odvezivanju mikrotubula na kinetohoru ovisnom o sili (Joglekar and Hunt, 2002). Dinamika mikrotubula ovisna o sili važan je mehanizam pokretanja oscilacija u modelima za stanice kvasca *budding yeast* (Sprague *et al.,* 2003; Gardner *et al.,* 2005) i u višim eukariotskim stanicama (Civelekoglu-Scholey *et al.,* 2006, 2013; Liu *et al.,* 2008; Armond *et al.,* 2015; Banigan *et al.,* 2015). Suprotno pretpostavci da tenzija na spoju kinetohora i mikrotubula promovira odvezivanje mikrotubula od kinetohore (Joglekar and Hunt, 2002), postoje istraživanja koja pokazuju da odsutstvo tenzije uzrokuje odvezivanje mikrotubula, čime je opisan mehanizam djelovanja proteina Aurora B kinaze u stanicama kvasaca (Gay *et al.,* 2012). U radu (Mary *et al.,* 2015) taj model je proširen sa

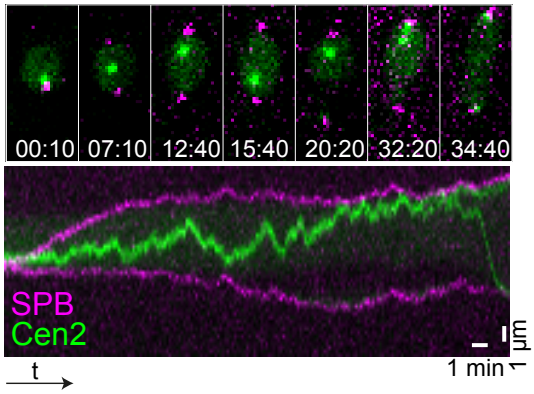
silama povlačenja ovisnima o duljini mikrotubula. Model (Gergely *et al.,* 2016) uključuje efekte motora kinezina-8 na dinamiku mikrotubula, proteinske komplekse između kinetohora i mikrotubula te sile klizanja u vretenu. Kompleksniji mehanizmi predloženi su za više eukariotske stanice (Civelekoglu-Scholey *et al.,* 2006, 2013; Liu *et al.,* 2008; Armond *et al.,* 2015; Banigan *et al.,* 2015), no fizikalni mehanizam koji navodi gibanja kromosoma u metafazi još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

2.1 Eksperimenti u sustavu stanica kvasaca

Kinezin-8 ima važnu ulogu u ograničavanju kretanja kinetohora oko centra diobenog vretena. Prvi dio teorijske studije prezentirane u ovom radu motiviran je eksperimentima u stanicama kvasaca *Schizosaccharomyces pombe*, gdje su polovi diobenog vretena (SPB) vizualizirani s Sad1-dsRed i centromera kromosoma (Cen2) s GFP markerom (Slika 2.1). Označavanje polova nam omogućava praćenje krajnjih položaja vretena te time i duljine vretena, dok označavanjem centromera pratimo položaj pojedinačnog para sestrinskih centromera i time položaje sestrinskih kinetohora vezanih za označene centromere. Snimanjem mitoze od početka profaze do početka anafaze, opažamo produljenje vretena, kao separaciju polova diobenog vretena te stohastičko kretanje para kinetohora tijekom metafaze i zatim razdjeljivanje kinetohora prema suprotnim polovima u anafazi (Slika 2.1). Kvantifikacijom položaja kinetohora u metafazi utvrdili smo da je u 94% vremenskih isječaka središnja točka između sestrinskih kinetohora smještena u središnjih 50% duljine vretena (n=2132 vremenskih isječaka iz 21 stanice). Zaključujemo da se kinetohore kreću oko središta vretena u neperturbiranim stanicama.



Slika 2.1: *Kretanja i pozicioniranje kinetohora u neperturbiranim stanicama. Kinetohore u vretenu su označene magenta bojom, a polovi diobenog vretena zelenom bojom. Gore: isječci iz snimke kretanja kinetohora. Dolje: položaj kinetohora u ovisnosti o vremenu. Skala duljine,* $1\ \mu m$.

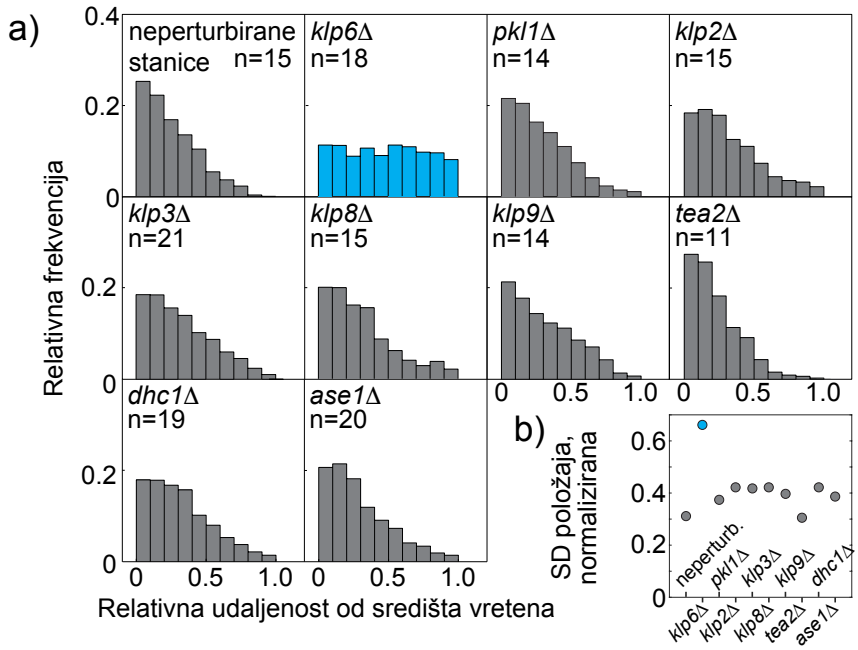


Slika 2.2: *Kretanja i pozicioniranje kinetohora u klp5Δ stanicama. Kinetohore u vretenu su označene magenta bojom, a polovi diobenog vretena zelenom bojom. Gore: isječci iz snimke kretanja kinetohora. Dolje: položaj kinetohora u ovisnosti o vremenu. Skala duljine,* $1\ \mu m$.

Kako bi istražili utjecaj kinezina-8 na kretanja i pozicioniranje kinetohora, analizirali smo stanice bez Klp5 motora (*klp5*Δ stanice) i potvrdili da se kinetohore kreću stohastički kao i u neperturbiranim stanicama. Međutim, kinetohore u *klp5*Δ stanicama tijekom svog gibanja prebrisale bi čitavu duljinu vretena (Slika 2.2). Sada u samo 67% vremenskih isječaka, središnju točku između kinetohora nalazimo u središnjih 50% vretena (n=2080 vremenskih isječaka iz 20 stanica). Kako bi provjerili da li je uzrok manje efikasnog centriranja u *klp5*Δ stanicama dulje

vreteno u usporedbi s neperturbiranim stanicama, u obje linije analizirana su vretena manja od $1.47\,\mu m$ (srednja vrijednost + standardna devijacija duljine vretena u neperturbiranim stanicama). Standardna devijacija središnje točke između kinetohora u odnosu na središte vretena iznosi 0.5 i 0.35 za *klp5*Δ, odnosno neperturbirane stanice, kada je duljina vretena normalizirana na interval [-1,1]. Ako izračunamo analogne standardne devijacije za oba slučaja uzimajući u obzir vretena svih duljina, dobivamo 0.53 i 0.34, za *klp5*Δ, odnosno neperturbirane stanice, čime možemo zaključiti da uzrok manjeg centrirajućeg potencijala nije u razlikama u duljinama vretena. Tako eksperimentalno utvrđujemo da motor Klp5 ograničava kretanja kinetohora na središte diobenog vretena te je taj rezultat u skladu s prijašnjim mjerenjima u kvascima (Mary *et al.,* 2015; Gergely *et al.,* 2016).

Nadalje, osim motora kinezina-8, istražene su uloge drugih motornih proteina u kretanju kinetohora. Ovdje je metoda istraživanja brisanje svih gena u kvascu *S. pombe* koji su identificirani da posjeduju homologe motorne domene kinezina (Schoch *et al.,* 2003) i domene teškog lanca dineina *dhc1* (Courtheoux *et al.,* 2007). Također, obrisan je pasivni protein *ase1* (Loiodice *et al.,* 2005; Yamashita *et al.,* 2005). Pripadnik obitelji kinezina-5, *cut7* u ovom istraživanju nije perturbiran, jer je njegovo brisanje letalno za stanicu (Hagan and Yanagida, 1992; Syrovatkina *et al.,* 2013). Rezultati pokazuju da svi mutatnti, osim stanica bez kinezina-8, *klp6*Δ, pokazuju opće kretanje kinetohora i distribuciju položaja koje odgovaraju onima u neperturbiranim stanicama (Slika 2.3). U mutantu *klp6*Δ distribucija položaja kinetohora gotovo je uniforma duž vretena, slično kao u prethodno opisanom mutantu *klp5*Δ. Ovi eksperimentalni rezultati pokazuju da brisanje motora Klp5 i Klp6 ima sličan efekt na gibanja kinetohora i njihovo pozicioniranje te su u skladu s prijašnjim mjerenjima (Mary *et al.,* 2015). S obzirom na sličan efekt dvaju motora, u daljnjem radu fokusirati ćemo se na učinke motora Klp5, zbog jednostavnosti održavanja linije. Zaključujemo da u kvascu *S. pombe* motori kinezina-8, Klp5/Klp6 imaju značajan ograničavajući učinak na pozicioniranje kinetohora u središte vretena, dok ostali kinezini, dinein i pasivni protein Ase1 ne utječu značajno na kinetohorna gibanja.

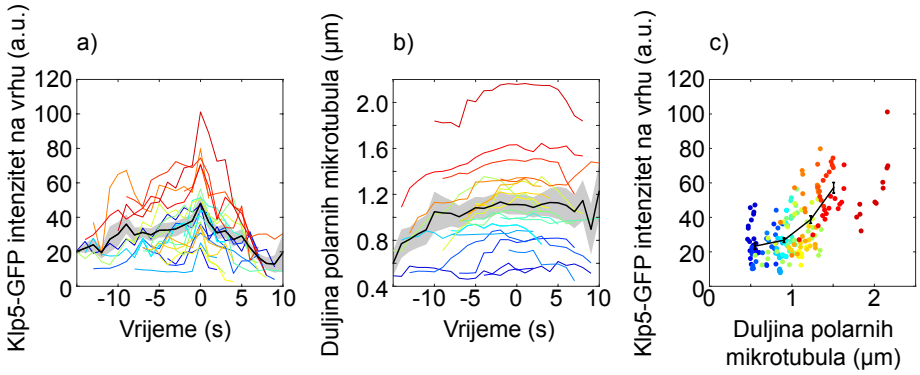


Slika 2.3: *a) Histogrami položaja kinetohora duž vretena za specifična uklanjanja molekularnih motora. b) Standardna devijacija položaja kinetohora od središta diobenog vretena, za stanice-mutante iz panela a). Duljine vretena su normalizirane na interval* $[-1,1]$.

Polarni mikrotubuli imaju manju učestalost katastrofe te se brže skraćuju u mutantima klp5Δ. U istraživanju utjecaja motora Klp5 na dinamiku mikrotubula u mitozi, fokusirali smo se na polarne mikrotubule, tj. mikrotubule koji rastu iz polova diobenog vretena pod kutem u odnosu na vreteno tijekom prometafaze te je time njihov plus kraj lokaliziran dalje od vretena te može biti praćen bez interferencije signala s interpolarnih i kinetohornih snopova mikrotubula (Zimmerman *et al.,* 2004; Vogel *et al.,* 2007; Kalinina *et al.,* 2013). Također, na polarne mikrotubule ne utječu sile generirane na kinetohorama ili u preklopima sa snopovima mikrotubula koje mogu utjecati na dinamiku mikrotubula koji se nalaze u samom vretenu. U našim mjerenjima promatramo najduži mikrotubul u snopu polarnih mikrotubula. Praćenjem polarnih mikrotubula označenih s mCherry-*atb2* u neperturbiranim i *klp5Δ* stanicama, omogućena nam je analiza njihovih duljina u vremenu (Klemm *et al.*, 2018). Podaci pokazuju da je frekvencija katastrofe niža u *klp5Δ* stanicama ($k_{\mathrm{cat}} = 1.3\, min^{-1}$) nego u neperturbiranim stanicama ($k_{\mathrm{cat}} = 1.9\, min^{-1}$) te da se u *klp5Δ* stanicama polarni mikrotubuli brže skraćuju

($v_s = -10.4 \pm 4.6\,\mu m/min$), nego u neperturbiranim stanicama ($v_s = -6.0 \pm 3.4\,\mu m/min$). Zaključujemo da motor Klp5 promovira katastrofu i usporava skraćivanje polarnih mikrotubula.

Motor Klp5 akumulira se na plus krajevima polarnih mikrotubula u ovisnosti o duljini mikrotubula. Kako bi razumjeli na koji način se motori kinezina-8 distribuiraju u vretenu, koristili smo liniju s Klp5-GFP označenim motorima te utvrdili da se Klp5 motori nalaze u nakupinama duž vretena. Kako je uočene nakupine teško usporediti sa samom duljinom mikrotubula u vretenu na kojima se nalaze, ponovno smo se fokusirali na polarne mikrotubule kod kojih nakupine Klp5-GFP uočavamo na plus krajevima rastućih mikrotubula (Klemm *et al.*, 2018). Signal motora dosegao bi maksimum prije trenutka u kojem se polarni mikrotubul krene skraćivati te se jačina signala povećava s povećanjem duljine polarnih mikrotubula (Slika 2.4.a) u skladu s prijašnjim mjerenjima. Porast u intenzitetu je bio mnogo brži za individualne mikrotubule, nego uprosječeni porast za nekoliko mikrotubula (usporediti nagibe obojenih skupova podataka, koji prikazuju pojedinačne polarne mikrotubule i nagib crne linije koja predstavlja prosjek (Slika 2.4)).

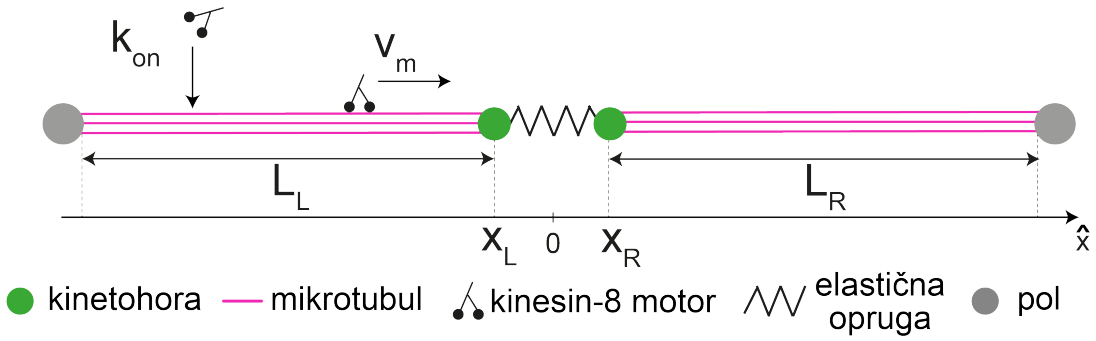


Slika 2.4: *a) Klp5-GFP intenzitet na slobodnom kraju polarnih mikrotubula i b) duljina mikrotubula iz a) kao funkcija vremena, za 21 mikrotubul. Svaki mikrotubul prikazan je u boji koja odgovara njegovoj prosječnoj duljini, od plave za kratke, do crvene za duge mikrotubule. Vrijeme 0 odgovara maksimalnom Klp5-GFP intenzitetu. Crna krivulja odgovara srednjoj vrijednosti, a osjenčano sivo područje SEM (engl. standard error of the mean). c) Klp5-GFP intenzitet ovisan o duljini mikrotubula iz panela a) i b). Najdulji mikrotubul nije uključen u izračun prosjeka.*

Kako bi procijenili prosječan broj Klp5-GFP molekula na plus kraju mikrotubula, usporedili smo intenzitet signala Klp5-GFP nakupina s intenzitetom signala za kojeg je poznat broj molekula koji ga uzrokuje, prema pristupu preuzetom iz (Ananthanarayanan *et al.,* 2013). Za ovaj pristup korištena je linija kvasaca s označenim centromernim proteinom Cse4 te je usporedbom intenziteta signala proteina Cse4 na kinetohori i Klp5-GFP motora na vrhu polarnih mikrotubula utvrđeno da se Klp5 motori akumuliraju na plus kraju mikrotubula u ovisnosti o duljini mikrotubula te da njihove nakupine tipično sadrže 30 molekula motora Klp5. Više mjerenja i informacija o eksperimentima se može pronaći u radu (Klemm *et al.,* 2018).

2.2 Minimalni model

U našem jednodimenzionalnom modelu opisujemo dva suprotno orijentirana snopa mikrotubula koja su povezana s parom sestrinskih kinetohora (Slika 2.5). Položaje desne i lijeve kinetohore u odnosu na središte diobenog vretena označujemo kao x_{R} i analogno x_{L}. Indeksi R i L označavaju desnu, odnosno lijevu stranu vretena. Gibanje kinetohora u vremenu računamo iz ravnoteže sila za svaku od kinetohora, danu jednadžbom (2.1).



Slika 2.5: *Shema jednodimenzionalnog teorijskog modela za kretanja kinetohora u metafazi.*

$$F_i \mp F_{\mathrm{el}} = 0, \qquad i = \mathrm{R}, \mathrm{L}. \tag{2.1}$$

Sila elastiče opruge $F_{\mathrm{el}} = k\Delta x$ je generirana proteinom kohezinom koji povezuje sestrinske kinetohore te je opisan pomoću Hookeove opruge, koja ima konstantu elastičnosti k, dok je produljenje opruge dano s $\Delta x = (x_{\mathrm{R}} - x_{\mathrm{L}}) - x_{\mathrm{rest}}$, gdje x_{rest} označava ravnotežno istegnuće opruge (Chacon *et al.,* 2014). Ukupna sila koju generiraju snopovi kinetohornih mikrotubula sadrži doprinose sili od rastućih i skraćujućih mikrotubula, $F_i = f_i^+ N_i^+ + f_i^- N_i^-$, gdje N_i^+ i N_i^-

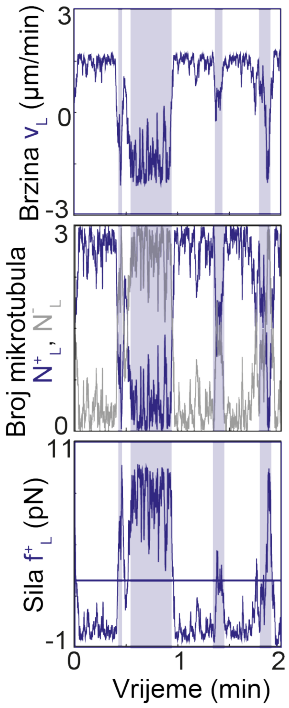
označavaju brojeve rastućih, odnosno skraćujućih mikrotubula. Ukupan broj mikrotubula koji su povezani s pojedinom kinetohorom jednak je za obje strane vretena, $N_{\mathrm{tot}} = N_i^+ + N_i^-$. Sile kojima mikrotubuli u snopu djeluju na kinetohore uzrokovane su polimerizacijom mikrotubula, f_i^+ i depolimerizacijom mikrotubula, f_i^-. Spomenute sile generirane su na plus krajevima mikrotubula te su analitički opisane linearnom ovisnošću sile o brzini (2.2). Mikrotubuli su u našem modelu rigidni i ravni te njhove duljine možemo izračunati kao $L_i = D/2 \mp x_i$, $i = \mathrm{R}, \mathrm{L}$, gdje je D duljina diobenog vretena.

$$f_{\mathrm{R}}^{\pm} = -f_{\mathrm{g,s}}\left(1 - \frac{1}{v_{\mathrm{g,s}}}\frac{dL_{\mathrm{R}}}{dt}\right), \tag{2.2a}$$

$$f_{\mathrm{L}}^{\pm} = f_{\mathrm{g,s}}\left(1 - \frac{1}{v_{\mathrm{g,s}}}\frac{dL_{\mathrm{L}}}{dt}\right). \tag{2.2b}$$

U izrazima (2.2), f_{g} opisuje silu koja je potrebna da se zaustavi rast mikrotubula, dok f_{s} opisuje silu koja zaustavlja skraćivanje mikrotubula. Brzina v_{g} opisuje brzinu slobodnog rasta mikrotubula u odsutstvu sile, dok v_{g} opisuje brzinu slobodnog skraćivanja mikrotubula. Dana linearna veza između sile i brzine je aproksimacija eksponencijalne funkcije kojom je opisano eksperimentalno mjerenje dane ovisnosti u radu (Akiyoshi *et al.,* 2010), za rast i skraćivanje mikrotubula.

Linearna aproksimacija korištena u ovom radu kvantitativno zadovoljava režim u kojem su sile generirane u sustavu manje od sila koje zaustavljaju rast i skraćivanje, a koje su tipične za naš sustav. Na primjer, kada se lijeva kinetohora kreće nadesno, $dx_{\mathrm{L}}/dt > 0$, broj rastućih mikrotubula je mnogo veći od broja skraćujućih mikrotubula, $N_{\mathrm{L}}^+ \gg N_{\mathrm{L}}^-$ te su sile koje generiraju rastući mikrotubuli mnogo manje od sile koja zaustavlja njihov rast, $f_{\mathrm{L}}^+ \ll f_{\mathrm{g}}$ (Slika 2.6). Analogna argumentacija vrijedi za slučaj kada se lijeva kinetohora kreće nalijevo. Rastući mikrotubuli koji prerastu duljinu vretena, $L_i > D$ ulaze u katastrofu, dok skraćujući mikrotubuli čija duljina postane negativna, $L_i < 0$, spasom ulaze u fazu rasta.



Slika 2.6: *Testiranje ispravnosti linearne aproksimacije ovisnosti sile o brzini u modelu. Neosjenčana područja u svim grafovima predstavljaju fazu rasta lijevog mikrotubula. Gore: brzina lijeve kinetohore u neosjenčanom području je* $v_L > 0$. *Sredina: broj rastućih mikrotubula je veći od broja skraćujućih u neosjenčanom području. Dolje: sila koju generiraju rastući mikrotubuli na lijevu kinetohoru u neosjenčanom području je i dalje manja od sile potrebne da se zaustavi rast mikrotubula,* f_g *(horizontalna linija) pa linearna aproksimacija vrijedi.*

Brojevi rastućih i skraćujućih mikrotubula u snopovima mijenjaju se dinamički (2.3).

$$\frac{dN_i^+}{dt} = k_{\mathrm{res},i}N_i^- - k_{\mathrm{cat},i}N_i^+ + \ell_i(N_i^+, N_i^-)\xi(t), \tag{2.3a}$$

$$\frac{dN_i^-}{dt} = -k_{\mathrm{res},i}N_i^- + k_{\mathrm{cat},i}N_i^+ - \ell_i(N_i^+, N_i^-)\xi(t), \qquad i = \mathrm{R, L.} \tag{2.3.b}$$

Učestalost kojom mikrotubuli prelaze iz faze skraćivanja u fazu rasta, učestalost spasa, povećava se kako se sila na kinetohori povećava (Akiyoshi *et al.,* 2010),

$$k_{\mathrm{res},i} = k_{\mathrm{r0}}\exp\left(\pm f_i^-/f_{\mathrm{r}}\right), \qquad i = \mathrm{R, L.} \tag{2.4}$$

Ovdje, k_{r0} označava ovisnost učestalosti spasa o tenziji, dok je f_{r} karakteristična sila spasa. Učestalost prijelaza iz faze rasta u fazu skraćivanja, zvana učestalost katastrofe dana je kao funkcija sile, $f(f_i^+)$ i broja motora kinezina-8, $g(Q_i)$, $k_{\mathrm{cat},i}(f_i^+, Q_i) = f(f_i^+)g(Q_i)$. Koristeći

Taylorov razvoj funkcije $g(Q_i)$ do prvog reda možemo aproksimirati $g(Q_i) = 1 + k_{c1}Q_i$. Uključujući ovisnost učestalosti katastrofe o sili na kinetohori (Akiyoshi *et al.,* 2010), učestalost katastrofe možemo zapisati kao,

$$k_{\mathrm{cat},i} = k_{\mathrm{c0}} \exp(\mp f_i^+/f_{\mathrm{c}})\,(1 + k_{\mathrm{c1}}Q_i), \qquad i = \mathrm{R, L.} \tag{2.5}$$

Parametar k_{c0} opisuje učestalost katastrofe u odsutstvu sile, dok je f_{c} karakteristična sila katastrofe. Drugi faktor opisuje porast učestalosti katastrofe s porastom broja kinezina-8 na plus kraju mikrotubula, Q_i, gdje k_{c1} opisuju porast učestalosti katastrofe koji uzrokuje jedan motor. Langevinovi članovi u izrazima (2.3) opisuju fluktuacije u događajima spasa i katastrofe te ih zapisujemo kao $\ell_i(N_i^+, N_i^-) = \sqrt{k_{\mathrm{res},i}N_i^- + k_{\mathrm{cat},i}N_i^+}$. Funkcija $\xi(t)$ opisuje Gaussov bijeli šum te zadovoljava $\langle\xi(t)\rangle = 0$ i $\langle\xi(t)\xi(t')\rangle = \delta(t - t')$, gdje je δ Diracova delta funkcija. U slučaju bez Langevinovog člana, $\ell_i(N_i^+, N_i^-) = 0$, naš model postaje deterministički. Pri numeričkom rješavanju modela koristili smo reflektivni rubni uvjet za slučaj kada broj mikrotubula padne ispod nule ili poraste iznad ukupnog broja mikrotubula, N_{tot}.

Kako bismo opisali distribuciju motora kinezina-8, koristili smo opis srednjeg polja s obzirom na gustoću motora duž mikrotubula, $\rho_i(u, t)$. Za koordinatni sustav koji ima ishodište na položaju kinetohore te pozitivan smjer koordinate *u* u smjeru plus kraja mikrotubula, u granici niske gustoće, gustoća motora kinezina-8 odgovara,

$$\frac{\partial\rho_i}{\partial t} = -\frac{\partial v_{\mathrm{m}}\rho_i}{\partial u} + k_{\mathrm{on}}c\theta(L_i - u)\theta(u) - k_{\mathrm{off}}\rho_i, \quad i = \mathrm{R, L.} \tag{2.6}$$

U danom izrazu motori se vežu i odvezuju na mikrotubule učestalostima k_{on}, odnosno k_{off} (Tischer *et al.,* 2010). Koncentracija motora u nukleoplazmi dana je s *c*, dok je brzina koračanja motora prema plus kraju mikrotubula dana s v_{m}. Heaviside step funkcija θ osigurava da se motori vežu samo duž mikrotubula. U slučaju da je brzina motora veća od brzine slobodnog rasta mikrotubula ($v_{\mathrm{m}} > v_g$), rješenje jednadžbe (2.6) glasi $\rho_i(u)|_{u=L_{\mathrm{i}}} = \frac{k_{\mathrm{on}}c}{k_{\mathrm{off}}}\left[1 - \exp\left(-\frac{k_{\mathrm{off}}}{v_{\mathrm{m}}}L_{\mathrm{i}}\right)\right]$. Korištenjem limesa u kojem je učestalost odvezivanja motora s mikrotubula vrlo mala, rješenje se može pojednostaviti na $\rho_i(u)|_{u=L_{\mathrm{i}}} = \frac{k_{\mathrm{on}}c}{v_{\mathrm{m}}}L_{\mathrm{i}}$. Promjena broja motora koji se akumuliraju na plus kraju mikrotubula opisana je s,

$$\frac{dQ_i}{dt} = \left(v_{\mathrm{m}} \pm \frac{dL_i}{dt}\right)\rho_i|_{u=L_i} - k_{\mathrm{d},i}Q_i, \qquad i = \mathrm{R, L.} \tag{2.7}$$

Izraz je baziran na eksperimentalno opaženoj akumulaciji motora kinezina-8 na plus kraju rastućih mikrotubula (Slika 2.4.c). Kako intenzitet kinezina-8 opada približno 3 puta tijekom 10 s

nakon postizanja maksimalne vrijednosti, dok se duljina mikrotubula smanji za 20% (Slika 2.4.a i b), koristimo eksponencijalnu ovisnost učestalosti odvezivanja motora o brzini skraćivanja, $k_{\mathrm{d},i} = k_{\mathrm{d0}}\exp(-k_{\mathrm{d1}}\, dL_i/dt)$, budući da je to najjednostavnija funkcija koja se mijenja brže od varijable o kojoj ovisi. Parametar k_{d0} opisuje učestalost odvezivanja motora s plus kraja mikrotubula konstantne duljine, dok k_{d1} opisuje ovisnost učestalosti odvezivanja o promjeni duljine mikrotubula. Ovaj član osigurava brzo odvezivanje motora s plus kraja mikrotubula jednom kada mikrotubul krene u fazu skraćivanja. Ovdje uvodimo relativan broj motora na plus kraju mikrotubula $q_i = Q_i/k_{\mathrm{on}}c$, pomoću kojeg izraz (2.7) postaje neovisan o parametrima k_{on} i c te tada drugi faktor u jednadžbi (2.5) postaje $k_{\mathrm{c1}}Q = k_{\mathrm{on}}ck_{\mathrm{c1}}q_i$. U cijelom modelu produkt $k_{\mathrm{on}}ck_{\mathrm{c1}}$ koristimo kao jedan parametar. Diferencijalne jednadžbe (2.1)-(2.7) integriramo numerički Euler-Maruyama shemom s vremenskim korakom $\Delta t = 0.1$ s, za parametre u (Tablica 2.1).

Izvod Langevinovih članova. Vodeća ideja u našem modelu je korištenje Langevinovog opisa za fluktuacije u broju rastućih i skraćujućih mikrotubula povezanih s kinetohorom. Langevinov opis prikladan je za opis sustava s fluktuacijama broja čestica (VanKampen, 1992) te nam omogućava istraživanje potencijala sustava da generira gibanja oko središta diobenog vretena. Langevinove članove računamo za *N* neovisnih mikrotubula koji stohastički prelaze iz rastućeg u skraćujuće stanje i obrnuto. U našem modelu stohastičke prijelaze između stanja definiramo kao nasumične događaje koji se događaju s određenim učestalostima. S k_{res} označujemo učestalost s kojom jedan mikrotubul prelazi iz skraćujućeg u rastuće stanje te s k_{cat} obrnuti prijelaz. Pretpostavljamo da se prema adijabatskoj aproksimaciji ti prijelazi događaju s konstantnim učestalostima prijelaza. Tako proizlazi da postoji vjerojatnost $k_{\mathrm{res}}n\Delta t$ da jedan od *n* mikrotubula u skraćujućem stanju prijeđe u rastuće stanje u intervalu vremena $(t, t+\Delta t)$. Ako u snopu imamo *N* mikrotubula, jedan od $(N-n)$ mikrotubula u rastućem stanju može prijeći u skraćujuću fazu s vjerojatnošću $k_{\mathrm{cat}}(N-n)\Delta t$. Ako prijeđemo na infinitezimalno male vremenske intervale u kojima je moguć samo jedan događaj (tj. $\Delta t \to dt, (\Delta t)^2 \to 0$), dobit ćemo $N+1$ diferencijalnih jednadžbi koje opisuje vjerojatnost da imamo *n* mikrotubula u skraćujućem stanju u vremenu *t*, koje vrijede za $n = 0, 1, \dots, N$,

$$\begin{aligned}\dot{p}_n = &-\big(\Omega(n \to n-1) + \Omega(n \to n+1)\big)p_n \\ &+\Omega(n-1 \to n)p_{n-1} + \Omega(n+1 \to n)p_{n+1}.\end{aligned} \tag{2.8}$$

Ovdje uvodimo globalne učestalosti prijelaza između globalnih stanja s *n* mikrotubula u skraćujućem stanju

$$\Omega(n \to n+1) = (N-n)k_{\text{cat}} \tag{2.9a}$$

$$\Omega(n \to n-1) = nk_{\text{res}}. \tag{2.9b}$$

Jednadžbu (2.8) nazivamo Master jednadžbom za vjerojatnost da se naš sustav nađe u stanju s *n* skraćujućih mikrotubula, p_n, gdje je prvi član smanjenje vjerojatnosti za postizanje stanja *n*, zbog prelaska u stanja $n-1$ i $n+1$, dok drugi i treći član označavaju rast vjerojatnosti za postizanjem stanja *n*, zbog prijelaza iz stanja $n-1$, odnosno $n+1$ u stanje n. Definiramo linearni "step" operator *E* za svaku funkciju $f(n)$, koja ovisi o diskretnoj varijabli *n*, kao $E[f(n)] = f(n+1)$ te njene potencije kao $E^l[f(n)] = f(n+l)$, za $l \in \mathbb{Z}$. Koristeći operator *E*, možemo nanovo zapisati Master jednadžbu ili definirati Langevinovu jednadžbu za promjenu broja mikrotubula u skraćujućem stanju, izraz (2.10), gdje za $N \gg 1$, definiramo $F(n) = \sum_l l\Omega_{n\to n-l}$ i $G(n) = \sum_l l^2\Omega_{n\to n-l}$ kao očekivanu vrijednost, odnosno varijancu. Član $\sqrt{G(n)}$ odgovara Langevinovim članovima u (2.3) (VanKampen, 1992).

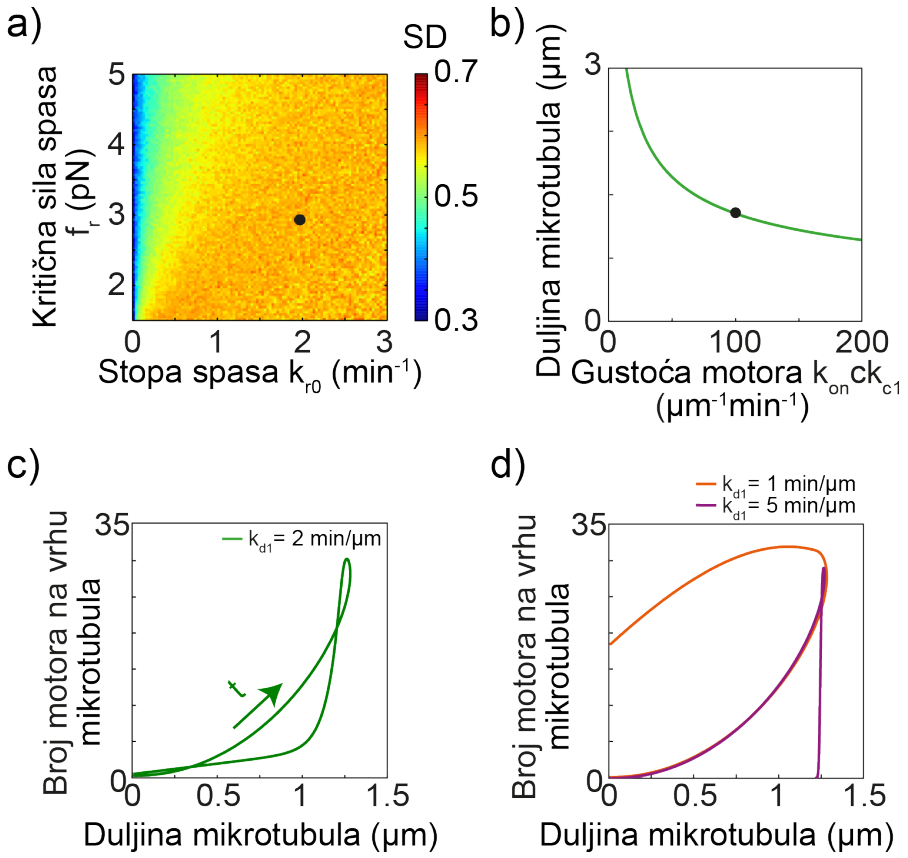
$$\frac{dn(t)}{dt} = F(n) + \sqrt{G(n)}\xi(t). \tag{2.10}$$

Primjetite da su izrazi (2.8) i (2.10) izvedeni iz fundamentalnih principa te ne uključuju dodatne parametre.

2.3 Izbor vrijednosti parametara

Parametri modela, (Tablica 2.1) preuzeti su iz literature, mjereni u suradničkom laboratoriju (IRB Tolić) ili određeni kako slijedi. Vrijednosti parametara k i x_{rest} preuzete su iz (Chacon *et al.,* 2014) te su unutar raspona vrijednosti korištenih u radu (Gay *et al.,* 2012). Slobodna brzina rasta mikrotubula u odsutstvu sile, v_{g} mjerena je u eksperimentima opisanim u ovo radu. Vrijednost je manja od vrijednosti mjerene u radovima (Kalinina *et al.,* 2013; Blackwell *et al.,* 2017), najvjerojatnije zbog različitog broja mikrotubula u snopu, druge linije kvasaca te temperature pri kojoj su vršena mjerenja. Slobodna brzina skraćivanja u odsutstvu sile, v_{s} je preuzeta iz eksperimenata laserskog rezanja, jer u tom slučaju mjerena brzina kinetohora odgovara brzini skraćivanja kinetohornih mikrotubula u odsutstvu sile sa suprotne strane vretena. Korištena vrijednost je manja od brzine skraćivanja polarnih mikrotubula mjerene u eksperimentalnom dijelu rada te od mjerene vrijednosti u radovima (Sagolla *et al.,* 2003; Kalinina *et al.,* 2013; Blackwell *et al.,* 2017). Vrijednost sile koja zaustavlja skraćivanje mikrotubula je odabrana kao

jednaka vrijednosti sile koja zaustavlja rast mikrotubula te taj izbor ne utječe ponašanje modela, jer se naš sustav jednadžbi nalazi u režimu postignutih sila koje su manje od sila zaustavljanja rasta i skraćivanja mikrotubula. Učestalost katastrofe u odsutstvu sile i motora kinezina-8, k_{c0} određena je iz eksperimenata brisanja motora kinezina-8 te je ta vrijednost manja od one korištene u radu (Blackwell *et al.,* 2017). Preostali parametri čije vrijendosti trebamo odrediti su k_{r0}, f_{r}, k_{d1} i produkt $k_{\mathrm{on}}ck_{\mathrm{c1}}$. Uspoređujući eksperimentalne i teorijske rezultate za distribuciju položaja kinetohora, u slučaju brisanja kinezina-8 (Slika 2.7.a i 2.2), $c = 0$ te uspoređujući duljine polarnih mikrotubula u slučaju s motorima kinezina-8, određene su vrijednosti korištene u izračunu konačnih numeričkih rezultata (Slika 2.7). Vrijednosti parametara k_{r0} i f_{r} nalaze se u rasponu vrijednosti mjerenih u *in vitro* eksperimentima (Akiyoshi *et al.,* 2010), $k_{\mathrm{r0}} = 1.43 \pm 0.47\ \mathrm{min}^{-1}$ i $f_{\mathrm{r}} = 6.4 \pm 4.2\ \mathrm{pN}$. Primjetite da je ovdje korištena vrijednost k_{r0} manja od vrijednosti iz (Mary *et al.,* 2015) te veća od vrijednosti iz (Blackwell *et al.,* 2017).



Slika 2.7: *a) Standardna devijacija (SD) središnje točke između kinetohora za različite vrijednosti učestalosti spasa k_{r0} i f_r je dana skalom boja, za model bez kinezina-8. Ostale vrijednosti parametara su kao u Tablici 2.1. Za svaku točku, standardna devijacija je računata za ukupno vrijeme $t = 1000\,min$. Veličina mreže je 100×100. Crna točka u svim panelima označava položaj u parametarskom prostoru za kojeg su dobivena konačna rješenja modela, Slika 2.8. b) Ovisnost duljine mikrotubula o parametru gustoće kinezina-8. c), d) Ovisnost broja kinezina-8 na slobodnom kraju polarnih mikrotubula za vrijednosti parametra k_{d1} dane u legendi.*

Parametar koji opisuje gustoću kinezina-8, $k_{\mathrm{on}}ck_{\mathrm{c1}}$ određen je pomoću eksperimentalno mjerenih duljina polarnih mikrotubula (Slika 2.7.b). Polarne mikrotubule modeliramo na sljedeći način: definiramo vrijednosti parametara $F_{\mathrm{el}} = 0$ (sila na plus kraj mikrotubula iščezava), $N_{\mathrm{tot}} = 1$, i početne uvjete $N_{\mathrm{L}}^{+} = 1$, $L_{\mathrm{L}} = 0$, and $q_{\mathrm{L}} = 0$. Primjetite da koristimo $N_{\mathrm{tot}} = 1$ jer u našim eksperimentima možemo pratiti snop sastavljen od najvjerojatnije jednog mikrotubula, tj.

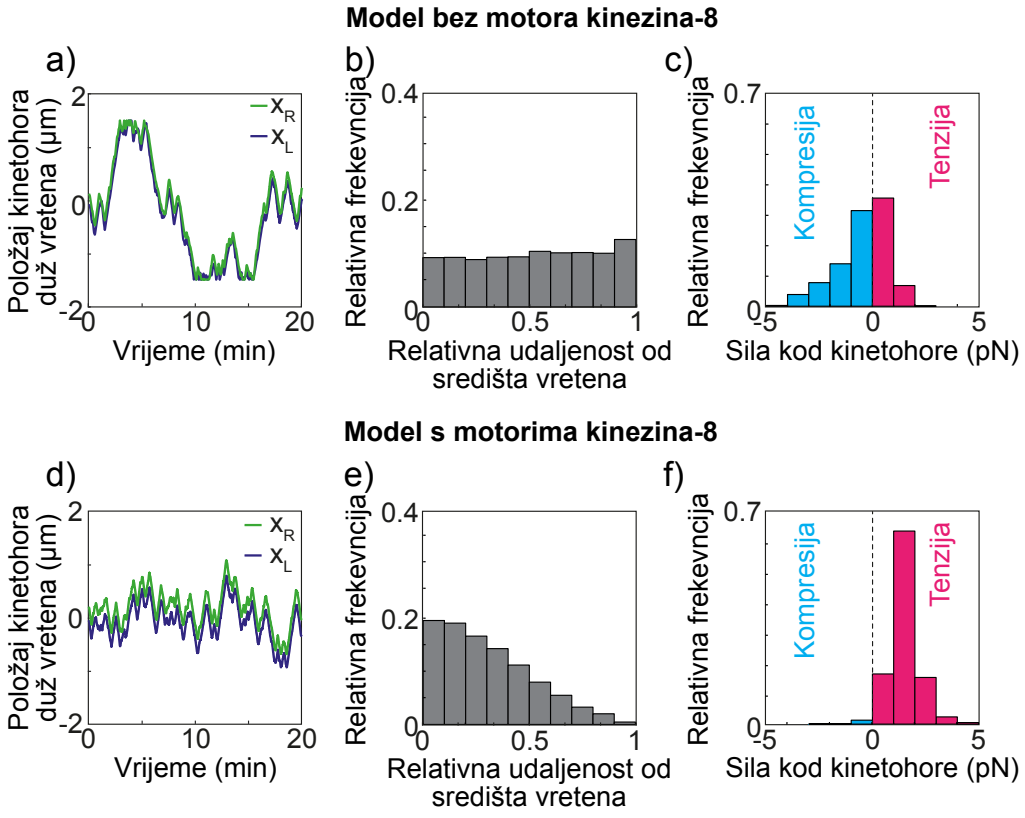
najduljeg mikrotubula u snopu. Ne uključujemo sile generirane kroz interakciju između ovojnice jezgre i mikrotubula jer one zahtijevaju dodatno proširenje modela. U slučaju modeliranja polarnih mikrotubula, jednadžbe su integrirane bez stohastičkih članova. Koristeći eksperimentalni rezultat da postoji oko 30 motora kinezina-8 na slobodnom kraju polarnog mikrotubula prije nego uđe u katastrofu, možemo odrediti vrijednost parametra $k_{\mathrm{on}}c = 100\ \mu\mathrm{m}^{-1}\mathrm{min}^{-1}$, uz vrijednost konstante $k_{\mathrm{c1}} = 1$. Parametar koji opisuje odvezivanje motora kinezina-8 s mikrotubula, k_{d1} je fiksiran kako bi najbolje reproducirao eksperimentalnu ovisnost broja motora kinezina-8 o duljini mikrotubula (Slika 2.7.c). Zaključujemo da vrijednost parametra $k_{\mathrm{d1}} = 2\ \mathrm{min}/\mu\mathrm{m}$ točnije reproducira eksperimente (Slika 2.4.c) u usporedbi s vrijednostima $k_{\mathrm{d1}} = 1\ \mathrm{min}/\mu\mathrm{m}$ i $k_{\mathrm{d1}} = 5\ \mathrm{min}/\mu\mathrm{m}$ (Slika 2.7.d).

Tablica 2.1: *Vrijednosti parametara korištene u poglavlju 2.*

	Parametar	**Vrijednost**	**Izvor**
k	Konstanta elastičnosti opruge	15 $pN/\mu m$	Chacón *et al*., 2014
x_{rest}	Slobodna duljina opruge	0.17 μm	Chacón *et al*., 2014
v_{g}	Slobodna brzina rasta mikrotubula	1.5 $\mu m/min$	mjereno
f_{g}	Sila zaustavljanja rasta mikrotubula	4 pN	Dogterom *et al.,* 1997
v_{s}	Slobodna brzina skraćivanja mikrotubula	$-2.5\ \mu m/min$	mjereno
f_{s}	Sila zaustavljanja skraćivanja mikrotubula	-4 pN	procijenjeno
k_{r0}	Učestalost spasa	2 min^{-1}	procijenjeno
f_{r}	Kritična sila spasa	3 pN	procijenjeno
k_{c0}	Učestalost katastrofe	1.3 min^{-1}	mjereno
f_{c}	Kritična sila katastrofe	2.3 pN	Akiyoshi *et al.*, 2010
$k_{\mathrm{on}}ck_{\mathrm{c1}}$	Parametar gustoće motora kinezina-8	100 $\mu m^{-1}min^{-1}$	procijenjeno
v_{m}	Brzina motora kinezina-8	3 $\mu m/min$	Glunčić *et al*., 2015
k_{d0}	Učestalost odvajanja motora	0.25 min^{-1}	Tischer *et al*., 2009
k_{d1}	Kritična učestalost odvajanja	2 $min/\mu m$	procijenjeno
D	Duljina vretena	3 μm	mjereno

2.4 Rezultati modela za dinamiku kinetohora u metafazi

Kako model sadrži veliki broj parametara koje nije bilo moguće eksperimentalno odrediti, pri rješavanju sustava od osam jednadžbi krenuli smo od pojednostavljenog slučaja modela u kojem nemamo motore kinezina-8, $c = 0$. Način određivanja vrijednosti nepoznatih parametara opisan je u poglavlju 2.3. Za dani slučaj numeričke simulacije pokazuju da se par kinetohora kreće duž vretena sa stohastičkim promjenama u smjeru gibanja (Slika 2.8.a). Model predviđa da u slučaju bez kinezina-8, kinetohore provode otprilike jednaku količinu vremena pod kompresijom (~60%) i pod tenzijom (~40%) (Slika 2.8.c). Distribucija položaja središnje točke za dani par kinetohora s obzirom na središte diobenog vretena za dani izbor parametara odgovara eksperimentalno mjerenoj vrijednosti, tj. pokazuje proširenje prostora u kojem se kinetohore kreću za vrijeme metafaze (Slika 2.8.b).



Slika 2.8: *Rezultati teorijskog modela za kretanja kinetohora u metafazi. a), d) Položaji desne (zeleno) i lijeve (plavo) kinetohore u vremenu za parametre u Tablici 2.1, za model bez i s motorima kinezina-8. b), e) Distribucija relativne udaljenosti od središta diobenog vretena za*

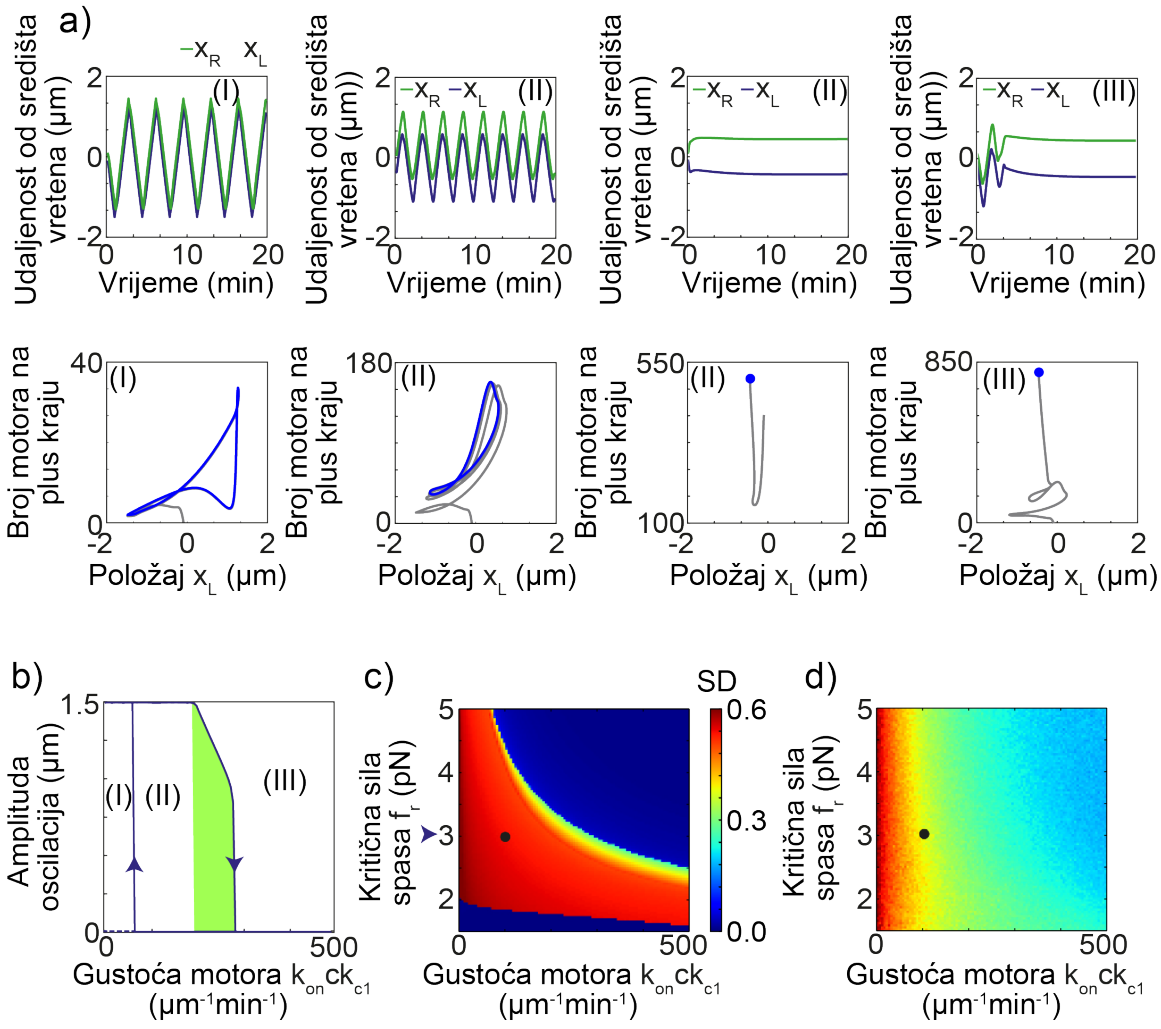
središnju točku između sestrinskih kinetohora, za model bez i s motorima kinezina-8. Vrijednost standardne devijacije za model bez motora za duljine vretena normalizirane na interval $[-1,1]$ *iznosi 0.6 te 0.37 za potpuni model. c), f) Sila na kinetohoru za model bez i s motorima kinezina-8. Negativne vrijednosti sila odgovaraju kompresiji (svjetlo plava), dok pozitivne odgovaraju tenziji (crveno).*

Za parametarski prostor određen na način dan u prethodnom poglavlju 2.3, numerički možemo odrediti rješenja kompletnog sustava, tj. sustava koji opisuje neperturbirane stanice u eksperimentima. Na (Slici 2.8.d) vidimo da kinetohore opet pokazuju usmjereno gibanje duž diobenog vretena uz stohastičke promjene u smjeru gibanja. Međutim, u usporedbi sa slučajem bez kinezina-8 primjećujemo da je gibanje ograničeno na središnju trećinu diobenog vretena. Centrirajući mehanizam motora kinezina-8 tako možemo kvantitativno uočiti u smanjenjoj standardnoj devijaciji položaja kinetohora u usporedbi s modelom bez kinezina-8 (Slike 2.8.e i b). Centrirajući efekt proizlazi iz akumulacije motora kinezina-8 na plus kraju mikrotubula koja ovisi o duljini samog mikrotubula (Slika 2.4). Akumulacija motora ovisna o duljini mikrotubula rezultira u učestalijoj katastrofi dužih mikrotubula te time i manje frekventnim kretanjima kinetohora dalje od centra diobenog vretena. U slučaju kompletnog modela, kinetohore će biti najčešće pod tenzijom (~98% vremena) (Slika 2.8.f), u suprotnosti s rezultatom za model bez kinezina-8 (Slika 2.8.c). Također, kompletan model reproducira histogram položaja kinetohora iz eksperimenata na neperturbiranim stanicama (usporedi Slike 2.8.e i 2.3) te time osigurava kvantitativnu potvrdu predikcija modela.

2.5 Utjecaj Langevinovog člana na parametarski prostor modela

Sljedeći cilj je istražiti kako definirani model generira stohastička kretanja kinetohora oko središta diobenog vretena. Kako bi proučili važnost stohastičkih članova koji opisuju fluktuacije u broju rastućih i skraćujućih mikrotubula, numerički smo riješili model za slučaj sa i bez stohastičkih članova. U slučaju bez stohastičkih članova naš sustav ostvaruje stabilne oscilacije oko centra diobenog vretena ili fiksni položaj u centru vretena za različite vrijednosti parametra koncentracije motora kinezina-8 (Slika 2.9.a). Za niske vrijednosti parametra koncentracije kinetohore osciliraju od pola do pola (Slika 2.9.a (I)). Za vrijednosti iz središnjeg raspona koncentracija oscilacije ostvaruju manju amplitudu te koegzistiraju sa stabilnom fiksnom točkom u centru diobenog vretena (Slika 2.9.a (II)). Za visoke koncentracije, postoji samo stabilna fiksna

točka, tj. kinetohore miruju u središtu (Slika 2.9.a (III)). Primjećujemo da s porastom koncentracije motora kinezina-8, nestabilna fiksna točka postaje stabilna, tj. sustav jednadžbi pokazuje postojanje podkritične Hopfove bifurkacije (Slika 2.9.b). Raspon koncentracija u kojem kinetohore pokazuju oscilatorna gibanja s amplitudom koja je manja od polovice duljine vretena, tj. postoje oscilacije s amplitudom koja odgovara biološki opaženim vrijednostima u neperturbiranim stanicama je veoma uzak (Slika 2.9.b, zeleno). Zaključujemo da model bez stohastičkog člana i s biološki relevantnim vrijednostima parametara generira rezultate u skladu s podkritičnom Hopfovom bifurkacijom.



Slika 2.9: *Utjecaj Langevinovih članova na dinamičko ponašanje modela i parametarski prostor. a) Rješenja modela bez Langevinovog člana $\ell_i(N_i^+, N_i^-) = 0$, za različite vrijednosti $k_{on}ck_{c1}$ i početne uvjete. Gore: položaj desne (zeleno) i lijeve (plavo) kinetohore u vremenu. Dolje: fazni dijagram ovisnosti broja motora kinezina-8 na plus kraju lijevog snopa mikrotubula o položaju*

lijeve kinetohore (sivo). Stabilno granično kolo je označeno plavom linijom i stabilna fiksna točka plavom točkom. Vrijednosti parametara i početni uvjeti: (I) $k_{on}ck_{c1} = 50\ \mu m^{-1}min^{-1}$, $Q_i = 0$*; (II, lijevo)* $k_{on}ck_{c1} = 250\ \mu m^{-1}min^{-1}$, $Q_i = 0$*; (II, desno)* $k_{on}ck_{c1} = 250\ \mu m^{-1}min^{-1}$, $Q_i = 400$*; (III)* $k_{on}ck_{c1} = 400\,\mu m^{-1}min^{-1}$, $Q_i = 0$. *(I)-(III) Preostali parametri su kao u Tablici 2.1. Početni uvjeti:* $x_{R,L} = \pm 0.1\,\mu m$, $N_R^+ = 2$, $N_R^- = 1$, $N_L^+ = 1$ *i* $N_L^- = 2$. *b) Bifurkacijski dijagram za model bez stohastičkog člana. Amplituda desne kinetohore u ovisnosti o parametru* $k_{on}ck_{c1}$ *. Histereze se pojavljuje za interval* $k_{on}ck_{c1} \approx 60 - 275\,\mu m^{-1}min^{-1}$. *Stabilne oscilacije od pola do pola (puna linija) i nestabilna fiksna točka (iscrtkana linija) pojavljuju se u području (I). Stabilne oscilacije i stabilna fiksna točka koegzistiraju u području (II). Amplituda oscilacija opada od bijelog područja do manjih vrijednosti u zelenom području (II). Stabilna fiksna točka se pojavljuje u regiji (III). c), d) Parametarski prostor za model bez i s Langevinovog člana. Skala boja odgovara vrijednostima standardne devijacije (SD) središnje točke između kinetohora za duljine vretena normalizirane na interval* $[-1,1]$*, kao funkcije parametara* $k_{on}ck_{c1}$ *i* f_r*. Za svaku točku jednadžbe su integrirane* $t = 1000\ min$. *Veličina mreže je* 100×100. *Ista skala boja odgovara panelima c) i d). Crna točka u parametarskom prostoru odgovara vrijednostima u Tablici 2.1. U c) strelica odgovara vrijednostima istraženima u b). U tamno plavom području za* $f_r < 2\ pN$ *kinetohore osciliraju u protufazi.*

Kako bi istražili parametarski prostor, varirali smo vrijednosti parametara koncentracije motora i kritične sile spasa. Rezultati pokazuju da najveći raspon u parametarskom prostoru odgovara oscilacijama od pola do pola (Slika 2.9.c, crveno) i stabilnoj fiksnoj točki u centru vretena (Slika 2.9.c, plavo). Raspon koncentracija za koje postoje oscilacije širi je za manje vrijednosti kritične sile spasa. Zaključujemo da ovisnost učestalosti spasa o sili promovira oscilacije.

Za iste parametre, istražili smo parametarski prostor u slučaju bez stohastičkog člana i kada u modelu imamo stohastički član (Slika 2.9.c, d). Slično grafu (Slika 2.9.b) u slučaju bez stohastičkog člana, raspon parametara koji generira biološki relevantna gibanja je uzak (Slika 2.9.c, između crvene i plave regije). Iznenađujuće, uključivanje stohastičkih članova u naš model uzrokuje značajno proširenje tražene regije u kojoj sustav generira biološki relevatne standardne devijacije položaja kinetohora od središta diobenog vretena te time osigurava potrebnu biološku varijabilnost kakvu opažamo u staničnim sustavima (Slika 2.9.d).

3 Proširenje modela za pozicioniranje i kretanja kinetohora u metafazi za ljudske stanice

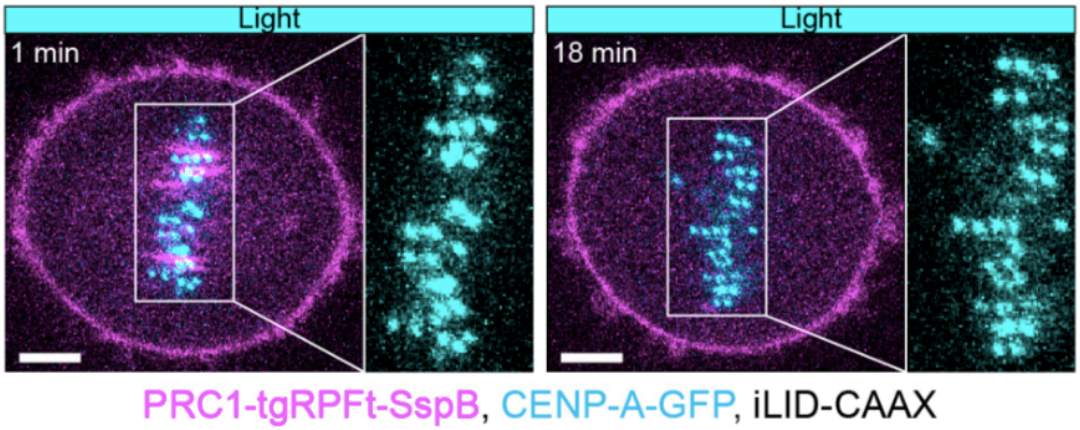
Model definiran u poglavlju 2.1 može biti proširen, kako bi opisao sustav stanice sisavaca, tj. ljudskih stanica. Proširen model za taj kompleksniji stanični sustav, definiran u nastavku, opisuje mehanizme pozicioniranja tj. kongresije kinetohora u metafaznu ravninu i oscilacije kinetohora. U danom sustavu kinetohorna vlakna se sastoje od otprilike 20 mikrotubula (McDonald *et al.,* 1992; Wendell *et al.,* 1993), te tada očekujemo manji utjecaj stohastičkih članova i pravilnije oscilacije. Uz motore kinezina-8, koji se pokazao kao važan centrirajući mehanizam, u model ćemo uključiti premosna vlakna (Kajtez *et al.,* 2016) jer su ona u ljudskim stanicama lateralno povezana sa snopovima kinetohornih vlakana pomoću pasivnih proteina (Vukušić *et al.,* 2017). Mehanizmi promatrani u dosadašnjim modelima uključuju opis dinamičke nestabilnosti mikrotubula vezanih za kinetohore putem diskretnih vezivnih mjesta (Joglekar and Hunt, 2002; Sprague *et al*., 2003), zatim utjecaj interpolarnih mikrotubula, koji se vežu putem kromokinezina na ruke kromosoma (Civelekoglu-Scholey *et al*., 2013) te doprinose motora kinezina-8, koji nakupljanjem ovisnim o duljini mikrotubula uzrokuju povećanje učestalosti katastrofe (Mary *et al.*, 2015; Klemm *et al*., 2018). U opisu dinamičke nestabilnosti mikrotubula i djelovanja motora kinezina-8 u ovom poglavlju prikazat ćemo kako mehanizmi vezani uz premosne mikrotubule doprinose pozicioniranju kinetohora i pripadajućim oscilacijama u metafazi ljudskih stanica.

3.1 Premosni mikrotubuli u diobenom vretenu ljudskih stanica

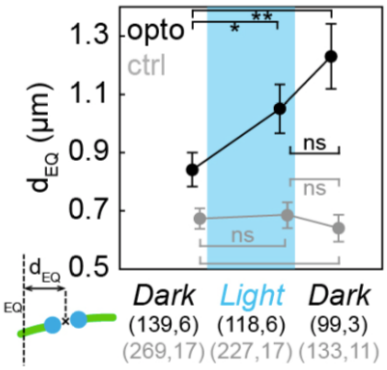
Eksperimentima je do sad pokazano da su gotovo svi parovi kinetohora premošćeni s premosnim mikrotubulima u metafazi (Polak *et al*., 2016) te da premosni mikrotubuli uravnotežuju tenziju na kinetohorama u diobenom vretenu tijekom metafaze (Kajtez *et al.*, 2016). U radovima koji proučavaju premosne mikrotubule uočeno je da se u antiparalelnim preklopima premosnih mikrotubula nalazi pasivni vezivni protein PRC1 te on nadalje služi kao marker pomoću kojeg označujemo položaj antirparalelnog preklopa u vretenu. Osim u eksperimentima svjetlosne mikroskopije, premosni mikrotubuli opaženi su i u elektronskoj mikroskopiji ljudskih vretena (Nixon *et al*., 2015).

Eksperimenti optogenetičkog uklanjanja pasivnih proteina PRC1. Kako bi se istražila dodatna mehanička svojstva premosnih mikrotubula, razvijen je eksperiment optogenetičkog

uklanjanja pasivnog proteina PRC1 iz diobenog vretena, tj. iz preklopa svih antiparalelnih mikrotubula (Jagrić *et al.*, 2019). Kako bi se uočio učinak na pozicioniranje kromosoma u metafaznom vretenu, kromosomi su označeni pomoću SiR-DNA (Slika 3.1) te je kvantificirana površina koju zauzimaju u diobenom vretenu, koju koristimo kao mjerilo njihovog poravnanja u metafaznu ravninu. Iznenađujuće, eksperimenti pokazuju da se površina koju zauzimaju kromosomi povećala nakon uklanjanja pasivnog proteina PRC1 iz antiparalelnih preklopa premosnih mikrotubula, sugerirajući da je poravnanje kromosoma, a time i kinetohora u metafazi narušeno (Slika 3.2). Također, uočeno je da uklanjanje proteina PRC1 uzrokuje stanjenje premosnih snopova te smanjenje inter-kinetohoralne udaljenosti, tj. smanjenje iznosa sile tenzije na kinetohorama. Uzevši u obzir optogenetička eksperimentalna mjerenja, u idućem poglavlju opisano je proširenje modela za pozicioniranje kinetohora u metafazi.



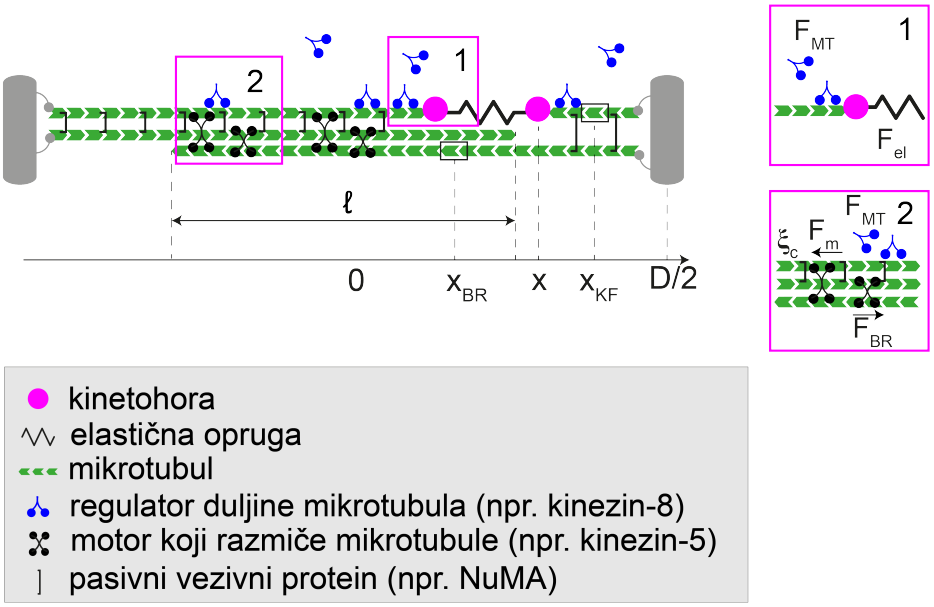
Slika 3.1: *Vreteno u U2OS stanicama u kojima je stabilno označen CENP-A-GFP (cijan) s tranzijentno označenim opto-PRC1 (magenta) i iLID-CAAX kompleks na početku (lijevi panel) i na kraju kontinuiranog izlaganja plavom svjetlu (desni panel). Uvećanja na desnoj strani svakog panela pokazuju područje koje sadrži samo kinetohore.* *Preuzeto iz (Jagrić et al., 2019).*



Slika 3.2: *Mjerenja udaljenosti između središta između sestrinskih kinetohora od ekvatorijalne ravnine vretena,* d_{EQ} *. Mjerenje je provedeno kako je pokazano na shemi lijevo dolje. Neperturbirane stanice prikazane su sivo, dok su stanice s opto-sustavom označene crno. Preuzeto iz (Jagrić et al., 2019).*

3.2 Proširenje modela za pozicioniranje kinetohora

Polazna ideja za proširenje teorijskog modela je uvođenje interakcije između premosnih i kinetohornih snopova mikrotubula, koja generira sile ovisne o duljini antiparalelnih preklopa snopova mikrotubula i koje imaju potencijal pozicionirati izmaknute kinetohore u središte diobenog vretena. Ovdje su snopovi kinetohornih mikrotubula opisani kao čvrsti i ravni štapovi koji su lateralno povezani s premosnim snopom mikrotubula te dinamički na svojim plus krajevima povezanim s kinetohorama (Slika 3.3).



Slika 3.3: *Shema modela za pozicioniranje kinetohora tijekom metafaze. Kinetohore (magenta) su u* $t = 0$ *izmaknute na rub preklopa premosnih mikrotubula (zeleno),* $x_R = 2.2\,\mu m$ *i* $x_L = 1.7\,\mu m$*. Dva panela desno prikazuju sile koje djeluju na pojedini segment sustava. Tako na kretanje kinetohora utječe elastična sila opruge,* F_{el} *te sila rastućih i skraćujućih mikrotubula,* F_{MT}*, čiju dinamiku reguliraju motori kinezina-8 (plavo). Na segment mikrotubula također utječu motori koji ih razmiču (crno) tj. generiraju sile* F_m *i* F_{BR}*. Pasivni vezivni proteini su označeni simbolom spajalice.*

Ovdje prikazani model je jednodimenzionalan te opisuje promjenu položaja para kinetohora. Sestrinske se kinetohore nalaze na pozicijama x_i, gdje se indeksi $i = \mathrm{R}, \mathrm{L}$ odnose na desnu i lijevu stranu vretena. Snopovi kinetohornih mikrotubula se protežu od nasuprotnih polova diobenog vretena na pozicijama $\pm D/2$ prema ekvatorijalnoj ravnini vretena te se vežu svojim plus krajevima na desnu, odnosno lijevu kinetohoru. Premosni mikrotubuli se također protežu od polova te se isprepliću u središtu diobenog vretena, tvoreći antiparalelni preklop konstantne duljine ℓ. Pretpostavka konstantne duljine preklopa proizlazi iz eksperimentalnih mjerenja (Kajtez *et al.*, 2016). Kinetohorni i premosni mikrotubuli se kližu jedan u odnosu na drugog, čime se mijenja u vremenu položaj segmenta na njihovoj rešetci, $x_{\mathrm{KF},i}$ i $x_{\mathrm{BR},i}$. Kinetohorni snopovi

sastavljeni su od 10 mikrotubula, koji mogu rasti i skraćivati se, dok su premosni snopovi sačinjeni od 1 mikrotubula, koji nema dinamike na svom plus kraju.

Kako bi modelirali interakciju kinetohornog i premosnog snopa mikrotubula, uravnotežujemo sile koje generiraju molekularni motori distribuirani duž antiparalelnih preklopa snopova mikrotubula i tenziju između sestrinskih kinetohora s viskoznim trenjem pasivnih vezivnih proteina (3.1).

$$N_{\mathrm{c},i}\xi_{\mathrm{c}}\frac{d\left(x_{\mathrm{KF},i}-x_{\mathrm{BR},i}\right)}{dt}=F_{\mathrm{m},i}\mp F_{\mathrm{el}},\qquad i=\mathrm{R,L}. \tag{3.1}$$

Broj pasivnih vezivnih proteina distribuiranih duž paralelnih preklopa kinetohornih i premosnih mikrotubula računamo kao $N_{\mathrm{c},i}\xi_{\mathrm{c}}=\pm n_{\mathrm{c}}L_i$, gdje je n_{c} konstantna linearna gustoća, a L_i, $i=\mathrm{R,L}$ duljina desnog i lijevog mikrotubula. Parametar ξ_{c} opisuje koeficijent trenja pasivnih vezivnih proteina. Sile motora raspoređenih duž antiparalelnih preklopa snopova mikrotubula ovise o brzini kinetohornog snopa u odnosu na premosni mikrotubul, $F_{\mathrm{m,R}}=N_{\mathrm{m,R}}f_{\mathrm{m}}\left(1-\frac{v_{\mathrm{KF,R}}-v_{\mathrm{BR,L}}}{v_{\mathrm{m}}}\right)$. Ovdje koristimo linearnu vezu između sile i brzine, gdje je f_{m} sila koja zaustavlja hodanje motora duž mikrotubula, a v_{m} slobodna brzina hodanja molekularnih motora. Jednadžba koja opisuje sile koje uzrokuju klizanje lijevog mikrotubula izvodi se tako da indeks R zamijenimo s L te promijenimo predznak konstanti f_{m} i v_{m}. Broj molekularnih motora koji uzrokuju klizanje mikrotubula računa se kao $N_{\mathrm{m},i}=n_{\mathrm{m}}(\ell/2\mp x_i)\theta(\ell/2\mp x_i)$, gdje je n_{m} linearna gustoća motora, a Heaviside step funkcija θ osigurava postojanje antiparalelnog preklopa.

Kretanje segmenta premosnog mikrotubula uzrokovano je silama generiranim putem motora distribuiranim duž antiparalelnog preklopa premosnih mikrotubula, F_{BR} te duž antiparalelnog preklopa premosnih i kinetohornih mikrotubula. Te sile su uravnotežene trenjem pasivnih vezivnih proteina koji povezuju snopove u njihovim paralelnim preklopima, kada se snopovi kližu jedan u odnosu na drugoga (3.2).

$$N_{\mathrm{c,R}}\xi_{\mathrm{c}}\frac{d\left(x_{\mathrm{BR,R}}-x_{\mathrm{KF,R}}\right)}{dt}=+F_{\mathrm{BR}}-F_{\mathrm{m,L}}. \tag{3.2}$$

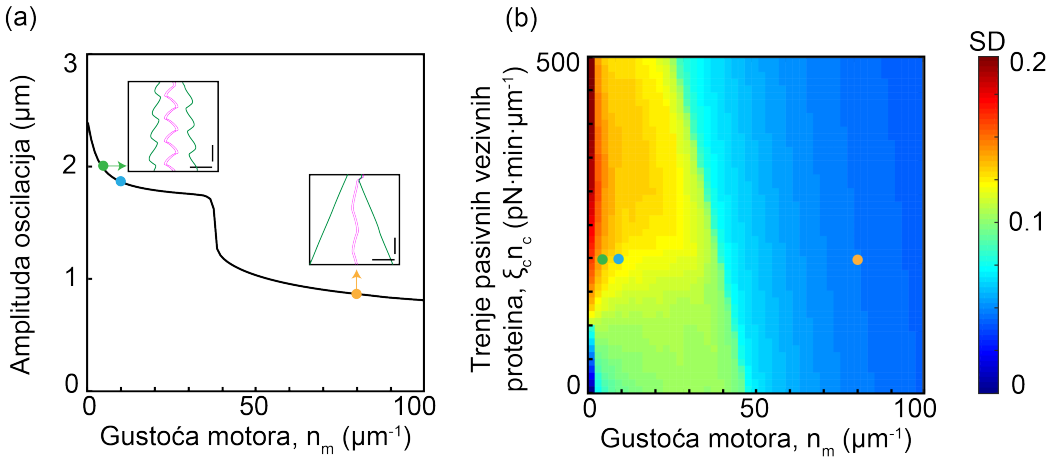
Sila generirana u preklopu premosnih snopova ovisi o relativnoj brzini snopova $F_{\mathrm{BR}}=N_{\mathrm{BR}}f_{\mathrm{m}}\left(1-\frac{v_{\mathrm{BR,R}}-v_{\mathrm{BR,L}}}{v_{\mathrm{m}}}\right)$, gdje je broj motora u preklopu premosnih mikrotubula dan kao $N_{\mathrm{BR}}=n_{\mathrm{m}}\ell$. Uzevši u obzir eksperimentalne rezultate iz (Vukušić *et al*., 2017), postavljamo uvjet na brzinu segmenata premosnih mikrotubula kao $v_{\mathrm{BR,R}}=-v_{\mathrm{BR,L}}$.

Promjena položaja sestrinskih kinetohora računata je pomoću izraza danih u prethodnom poglavlju, izrazi (2), do na zamjenu promjene duljine kinetohornog mikrotubula s relativnom brzinom kinetohora u odnosu na pripadajući segment snopa kinetohornih mikrotubula u izrazima (2), $dL_i/dt = \mp d\left(x_i - x_{\mathrm{KF},i}\right)/dt$. Brojevi rastućih i skraćujućih mikrotubula u snopu kinetohornih mikrotubula opet se mijenjaju dinamički, te učestalosti spasa i katastrofe ovise o sili generiranoj na kinetohoru, dok učestalost katastrofe ovisi o broju motora kinezina-8 koji se akumuliraju na kinetohorni mikrotubul ovisno o njegovoj duljini (2). Promjena broja mikrotubula u kinetohornom snopu opisana je pomoću stohastičke Langevinove jednadžbe, koja može prijeći u deterministički režim uz uvjet $\ell_i(N_i^+, N_i^-) = 0$.

3.3 Izbor vrijednosti parametara

Parametri korišteni u ovom poglavlju preuzeti su iz literature, mjereni u eksperimentalnom dijelu rada u 2. poglavlju ili određeni ovdje (Tablica 3.1). Parametri vezani za centrirajući mehanizam generiran putem antiparalelnog preklopa premosnih mikrotubula, n_{m} i $\xi_{\mathrm{c}} n_{\mathrm{c}}$ dodatno su istraženi. Promatrali smo njihov utjecaj na amplitudu oscilatornog gibanja kinetohora u determinističkom slučaju (Slika 3.4.a). Analizom parametarskog prostora uočena su dva odvojena režima u kretanju kinetohora. Za fiksiranu vrijednost parametra $\xi_{\mathrm{c}} n_{\mathrm{c}}$ i male vrijednosti koncentracije molekularnih motora, n_{m}, amplituda oscilacija središnje točke između kinetohora bit će dominantno određena koncentracijom motora kinezina-8 na plus kraju kinetohornih mikrotubula kao što je pokazano u 2. poglavlju. U ovom režimu, bez stohastičkog člana, brzina segmenta kinetohornog snopa bit će korelirana s brzinom kinetohore jer je iznos sile klizanja ovisne o duljini antiparalelnih preklopa smanjen te ne doprinosi značajno generiranju tenzije i posljedično povećanju učestalosti spasa kinetohornih mikrotubula. Za veće vrijendosti parametra n_{m}, amplituda oscilacija će se smanjiti zbog povećanja sile klizanja uzrokovane molekularnim motorima u antiparalelnim preklopima kinetohornih mikrotubula. Veći iznosi sila klizanja u ovom slučaju povećati će učestalost katastrofe te dovesti do frekventnijih promjena u smjeru gibanja kinetohora, tj. do manjeg perioda i amplitude oscilacija. U ovom slučaju, trenje između snopova mikrotubula također će porasti i dovesti do smanjena korelacije u brzini segmenta kinetohornog snopa i kinetohora te približiti iznos brzine klizanja segmenta kinetohornog snopa brzini klizanja premosnog snopa mikrotubula. Ovisnost amplitude središnje točke između kinetohora o trenju pasivnih vezivnih proteina, $\xi_{\mathrm{c}} n_{\mathrm{c}}$ (Slika 3.4.b) pokazuje da sile trenja ovisne o duljini paralelnih preklopa utječu na dinamiku

kinetohora na sličan način kao i sile klizanja, međutim gibanja kinetohora robusnija su na varijacije u vrijednosti parametra $\xi_c n_c$.



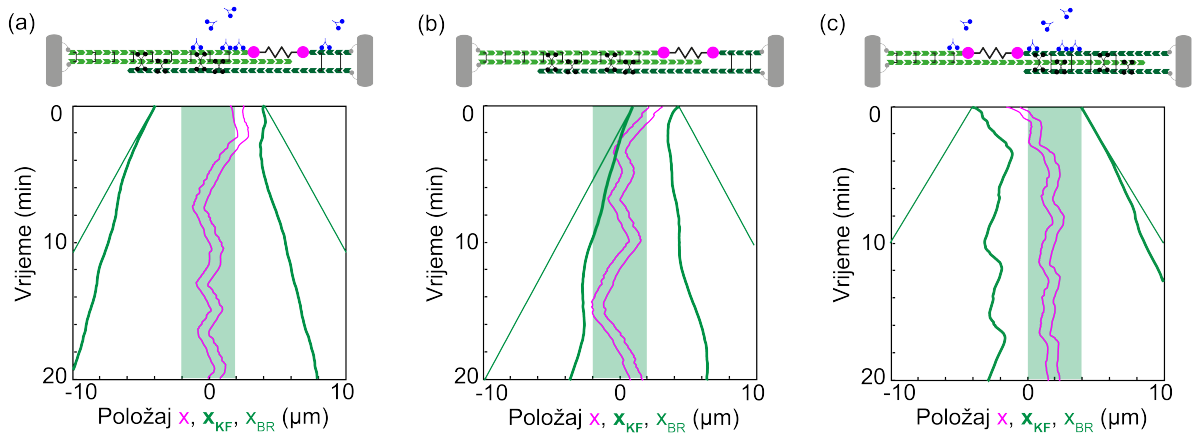
Slika 3.4: *a) Utjecaj parametra linearne gustoće motora koji razmiču mikrotubule na amplitudu oscilacija kinetohora za deterministički model. Skala duljine i vremena,* $10\ \mu m$ *i* $10\ min$*. b) Istraživanje parametraskog prostora za parametre jakosti trenja pasivnih proteina,* $\xi_c n_c$ *i linearne gustoće motora koji razmiču mikrotubule,* n_m*. Skalom boja je označena standardna devijacija (SD) središnje točke između sestrinskih kinetohora od središta diobenog vretena normirana na interval* $[-1,1]$*. Obojene točke odgovaraju istim vrijednostima parametara u oba panela. Plava točka odgovara vrijednostima iz Tablice 3.1.*

3.4 Kinetohore se pozicioniraju u odnosu na položaj snopa premosnih mikrotubula

Za početne uvjete dane u (Slika 3.3) i parametre u (Tablica 3.1), numerička rješenja potpunog modela (Slika 3.5.a) pokazuju da se izmaknuti par kinetohora vraća u središte diobenog vretena te oscilira uz stohastičke promjene u smjeru gibanja oko središta vretena, dok snopovi kinetohornih mikrotubula kližu relativno prema snopovima premosnih mikrotubula. Također, neovisna predikcija našeg modela pokazuje da će brzina segmenta kinetohornog snopa biti manja od brzine segmenta premosnog snopa. U slučaju bez motora kinezina-8 koji reguliraju dujinu mikrotubula također uočavamo centriranje kinetohora u odnosu na središte diobenog vretena, tj. u odnosu na položaj premosnog snopa mikrotubula (Slika 3.5.b). Također, u ovom slučaju bez motora kinezina-8, uočeno je povećanje amplitude oscilacija u skladu s eksperimentima brisanja motora kinezina-8 (Stumpff et al., 2012).

Tablica 3.1: *Vrijednosti parametara korištene u poglavlju 3.*

	Parametar	**Vrijednost**	**Izvor**
k	Konstanta elastičnosti opruge	$100\ pN/\mu m$	procijenjeno
x_{rest}	Slobodna duljina opruge	$0.66\ \mu m$	mjereno
v_{g}	Slobodna brzina rasta mikrotubula	$0.6\ \mu m/min$	mjereno
f_{g}	Sila zaustavljanja rasta mikrotubula	4 pN	Dogterom *et al.,* 1997
v_{s}	Slobodna brzina skraćivanja mikrotubula	$-3.5\ \mu m/min$	mjereno
f_{s}	Sila zaustavljanja skraćivanja mikrotubula	-4 pN	procijenjeno
k_{r0}	Učestalost spasa	$1.43\ min^{-1}$	Akiyoshi *et al.*, 2010
f_{r}	Kritična sila spasa	6.4 pN	Akiyoshi *et al.*, 2010
k_{c0}	Učestalost katastrofe	$0.5\ min^{-1}$	mjereno
f_{c}	Kritična sila katastrofe	$2.3\ pN$	Akiyoshi *et al.*, 2010
$k_{\mathrm{on}}c$	Parametar gustoće motora kinezina-8	$1\ \mu m^{-1}min^{-1}$	procijenjeno
v_{m}	Brzina motora kinezina-8	$3\ \mu m/min$	Glunčić *et al*., 2015
k_{d0}	Učestalost odvajanja motora	$0.25\ min^{-1}$	Tischer *et al*., 2009
k_{d1}	Kritična učestalost odvajanja	$2\ min/\mu m$	procijenjeno
D	Duljina vretena	$5\ \mu m$	mjereno
v_{m}	Slobodna brzina motora koji razmiču mikrotubule	$1.2\ \mu m/min$	mjereno
f_{m}	Sila zaustavljanja motora	4 pN	Valentine *et al.*, 2006
n_{m}	Linearna gustoća motora koji razmiču mikrotubule	$5\ \mu m^{-1}$	procijenjeno
$\xi_{\mathrm{c}}n_{\mathrm{c}}$	Koeficijent trenja pasivnih vezivnih proteina	$20\ pNmin/\mu m^2$	procijenjeno



Slika 3.5: *Rješenja modela za pozicioniranje kinetohora. a) Potpuni model u kojem promatramo pozicioniranje kinetohora koje su u početnom trenutku izmaknute na rub antiparalelnog preklopa premosnih mikrotubula. b) Rješenja modela bez motora kinezina-8. Par kinetohora oscilira oko središta diobenog vretena i u odsutstvu motora kinezina-8. c) Kinetohore prate položaj izmaknutog snopa premosnih mikrotubula.*

Kako bi istražili centrirajući potencijal sila ovisnih o duljini mikrotubula, izmaknuli smo antiparalelni preklop premosnih mikrotubula, postavljanjem položaja plus krajeva premosnih mikrotubula, $x_{\mathrm{end},i}$ na $(x_{\mathrm{end,R}}, x_{\mathrm{end,L}}) = (4, 0)$ te postavljanjem početnih položaja kinetohora, $(x_{\mathrm{R}}, x_{\mathrm{L}}) = (1.5, 0.5)$. Zaključujemo da sile ovisne o duljini, generirane pomoću molekularnih motora i pasivnih vezivnih proteina, navode pozicioniranje para kinetohora u odnosu na središte antiparalelnog preklopa premosnih mikrotubula (Slika 3.5.c) uz razliku u brzini klizanja premosnih mikrotubula u odnosu na kinetohorni snop, a koja je rezultat aktivnih motornih veza koje dozvoljavaju lateralno smicanje između snopova mikrotubula.

4 Teorijski model za razdvajanje kinetohora u anafazi

Poglavlje 4 prikazuje rezultate rada (Vukušić *et al.*, 2017). Faza tijekom stanične diobe u kojoj dolazi do razdvajanja kromosoma naziva se anafaza te ona uključuje gibanje kromosoma iz centralne ravnine diobenog vretena prema polovima i produljenje samog diobenog vretena. Gibanje kromosoma uzrokovano je mehanizmom u kojem kinetohore stimuliraju depolimerizaciju kinetohornih mikrotubula na njihovim plus krajevima, nazvanog Pac-man (McIntosh *et al.*, 2012; Maiato *et al.*, 2010), te mehanizmom toka prema polu (engl. poleward flux), tj. translacijom mikrotubula prema polu popraćenoj depolimerizacijom na polu (Mitchison, 1989; Mitchison and Salmon, 1992). Razmicanje interpolarnih mikrotubula (Saxton and McIntosh, 1987) i povlačenje sa staničnog korteksa pomoću astralnih mikrotubula (Aist *et al.*, 1993) uzrokuju razdvajanje polova diobenog vretena te tako doprinose segregaciji kromosoma.

Da bi se razumjeli mehanizmi u staničnoj diobi, pored eksperimentalnih istraživanja također su razvijeni fizikalni modeli koji teorijski opisuju najvažnije komponente vretena. Rezultati istraživanja na zamecima mušice Drosophila melanogaster (Brust-Mascher *et al.*, 2004) doveli su do predlaganja modela molekularnog mehanizma u kojem aktivni proteinski motor kinezin-5 kontinuirano razmiče dinamički nestabilne interpolarne mikrotubule prema polovima. Pokazano je da motori koji razmiču mikrotubule mogu generirati sile čiji je iznos barem za red veličine veći od karakterističnog viskoznog trenja polova diobenog vretena prilikom gibanja kroz citoplazmu stanice. Također, u model je uključen motor kinezin-13 koji na polovima depolimeriziranjem interpolarnih mikrotubula klizanje mikrotubula pretvara u mehanizam toka, i kinezin-4 koji ima ulogu u koordinaciji gušenja mehanizma toka i pokretanja produljenja diobenog vretena. Svi fizikalni opisi djelovanja molekularnih motora temelje se na linearnoj ovisnosti brzine gibanja motora o sili koju vrše motori. Ovisnost brzine o sili eksperimentalno je pokazana, a linearna ovisnost dobra je aproksimacija (Svoboda and Block, 1994; Coppin *et al.*, 1997; Howard, 2001). Slični modeli (Cytrynbaum *et al.*, 2003; Ferenz *et al.*, 2009) predlažu ponovno kombinaciju motora: kinezina-5 koji razdvaja polove diobenog vretena razmicanjem interpolarnih mikrotubula, dineina koji veže astralne mikrotubule za stanični korteks i dodatno povlači polove prema suprotnim krajevima stanice te kinezina-14 ili dineina koji povezuju interpolarne mikrotubule i generiraju silu koja privlači polove jednog prema drugom, tj. suprotstavlja se sili koju vrši kinezin-5. Modeli koji uključuju antagonističke sile objašnjavaju

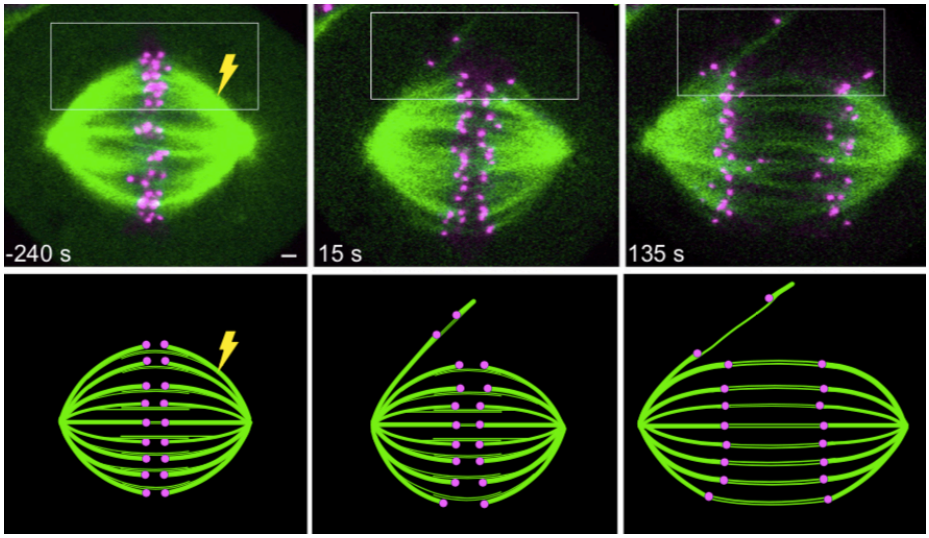
zašto se polovi nalaze na konstantnoj udaljenosti nakon uspostave ravnotežnog stanja. Narušavanjem te ravnoteže dolazi do razdvajanja polova diobenog vretena.

Proširenje modela anafaze (Wollman *et al.*, 2008) dodavanjem nove klase mikrotubula koja će povezivati polove direktno s rukama pojedinih kromosoma, uz zadržavanje kinetohornih mikrotubula, interpolarnih i astralnih mikrotubula te uključivanjem motora koji će generirati polimerizaciju i depolimerizaciju plus krajeva kinetohornih mikrotubula i polimerizaciju interpolarnih mikrotubula dobiva se kompleksan sustav kojim je moguće opisati produljenje vretena i razdvajanje kinetohora.

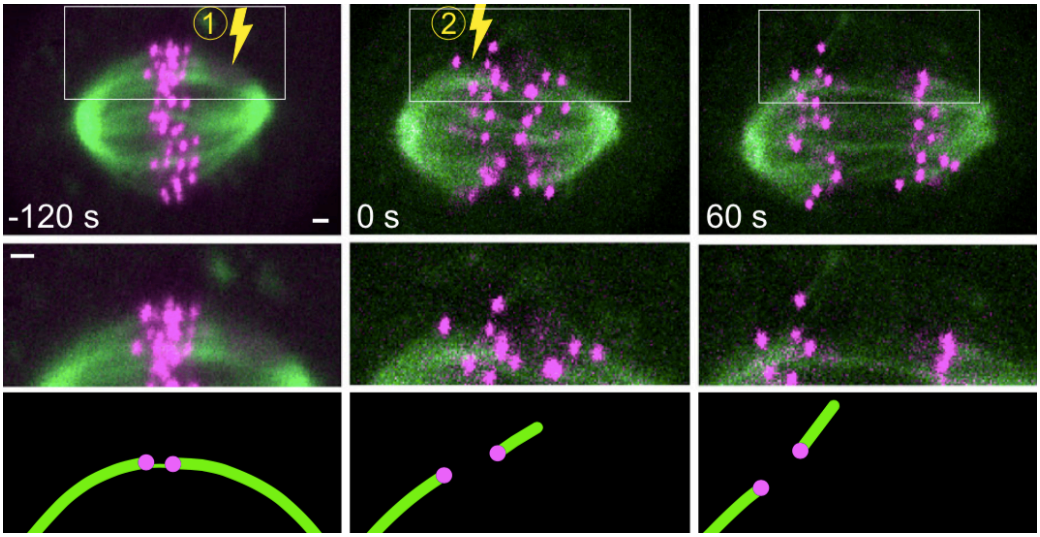
Usprkos intenzivnom istraživanju anafaze u raznim modalnim organizmima, mehanizam i molekularni pokretači razdvajanja kromosoma u ljudskim stanicama još uvijek nisu dobro proučeni. Dosad provedena istraživanja anafaze u ljudskim stanicama pokazala su važnost dinamičnih krajeva kinetohornih mikrotubla (Sikirzhytski *et al.*, 2014; Stumpff *et al*., 2008) tijekom gibanja kromosoma. Međutim, najnovija istraživanja pokazuju da su sestrinski kinetohorni mikrotubuli lateralno vezani duž svoje duljine s premosnim mikrotubulima (Kajtez *et al*., 2016; Tolić and Pavin, 2016) te to opažanje ukazuje na mogućnost postojanja neistraženih mehanizama koji pokreću razdvajanje kromosoma.

4.1 Eksperimenti laserskog rezanja snopova premosnih vlakana

Eksperimenti laserskog rezanja na ljudskim stanicama pokazali su da se, prilikom rezanja snopova kinetohornih i premosnih mikrotubula u blizini jednog pola, njima pridružene kinetohore nastavljaju razdvajati kao i u slučaju bez perturbacije čime je pokazano da polovi diobenog vretena nisu nužni za razdvajanje kinetohora (Slika 4.1). U dodatnim eksperimentima, u kojima je uz odvajanje snopa kinetohornih i premosnih mikrotubula od pola prerezan i snop premosnih mikrotubula između samih kinetohora, do razdvajanja ne dolazi te je time pokazana neophodnost snopa premosnih mikrotubula tijekom anafaze (Slika 4.2). Uz to, njihova antiparalelna organizacija i vezanje na sestrinske kinetohorne mikrotubule pomoću pasivnih proteina glavna su motivacija za razvitak novog fizikalnog modela u kojem premosni mikrotubuli imaju važnu ulogu u centriranju kinetohora u metafazi i njihovom razdvajanju tijekom anafaze.



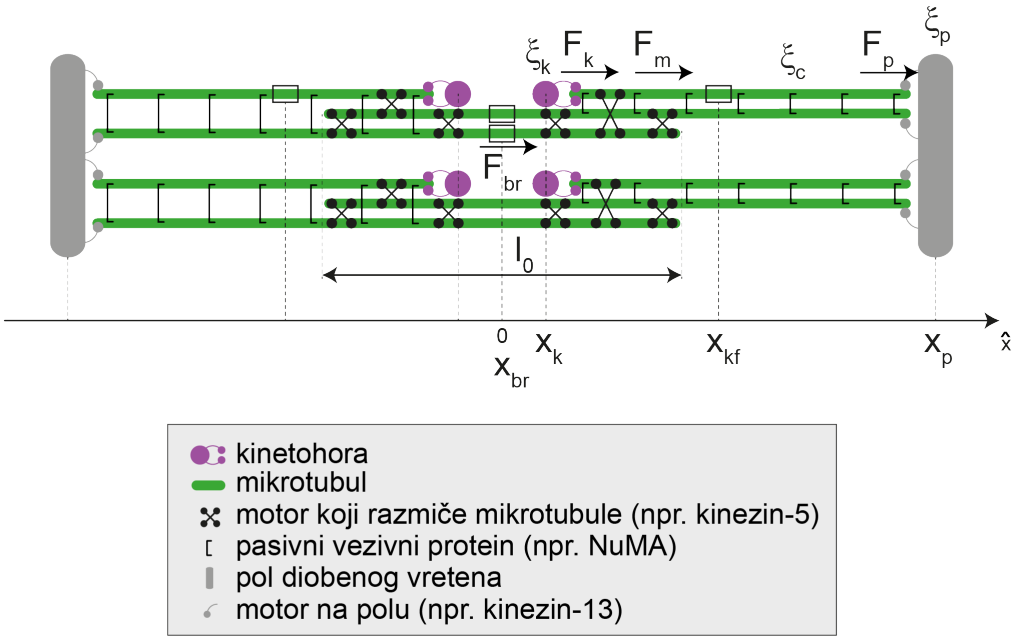
Slika 4.1: *Gore: eksperiment laserskog rezanja kinetohornog snopa mikrotubula. Dolje: shema vretena tijekom laserskog rezanja. Vremenski isječci vretena u U2OS stanicama, u kojima je obilježen centromerni protein CENP-A-GFP (magenta), pomoću kojeg se prati kretanje kinetohora i mCherry- α-tubulin (zeleno) za oznaku mikrotubula. Vanjski kinetohorni snop je prerezan* 2.5 μm *od kinetohore u metafazi (oznaka munje). Vrijeme 0 označava početak anafaze. Skala duljine,* 1 μm.



Slika 4.2: *Gore: eksperiment dvostrukog laserskog rezanja vanjskog kinetohornog i premosnog snopa mikrotubula. Sredina, uvećanje vretena tijekom rezanja. Dolje: shema vretena tijekom laserskog rezanja. Prvo je prerezan vanjski kinetohorni snop (oznaka munje), a zatim s početkom anafaze premosni snop između kinetohora. Vrijeme 0 označava početak anafaze. Skala duljine,* 1 μm.

4.2 Minimalni model za razdvajanje kinetohora

Model opisan u nastavku uključuje mehanizam generiranja sile u snopovima premosnih mikrotubula putem sila ovisnih o duljini preklopa antiparalelnih mikrotubula kao što je uvedeno u poglavlju 3. Model je ponovno jednodimenzionalan te opisuje sustav sastavljen od dva para sestrinskih kinetohora i njima pridruženih kinetohornih snopova koji povezuju kinetohore s polovima diobenog vretena i snopove premosnih mikrotubula koji se protežu od nasuptronih polova i isprepliću u središtu vretena (Slika 4.3). Ovako definiran sustav predstavlja minimalan model nužan za objašnjenje eksperimenata laserskog rezanja.



Slika 4.3: *Shema modela. Kinetohore (magenta) se početno* $(t = 0)$ *nalaze na položajima* $x_{\mathrm{k}}^{\pm} = \pm 0.5\,\mu m$, *polovi na* $x_{\mathrm{p}}^{\pm} = \pm 5\,\mu m$, *segment kinetohornog snopa na* $x_{\mathrm{kf}}^{\pm} = \pm 3\,\mu m$ *te premosnog snopa na* $x_{\mathrm{br}}^{\pm} = 0$. *Mikrotubuli su označeni zeleno, polovi sivo, molekularni motori crno, a pasivni proteini su označeni crnim spajalicama.*

Položaji jednog para kinetohora i polova diobenog vretena dani su kao $x_{\mathrm{k}}^{\pm}$ i $x_{\mathrm{p}}^{\pm}$. Položaji kinetohornih i premosnih vlakana, $x_{\mathrm{kf}}^{\pm}$ i $x_{\mathrm{br}}^{\pm}$, dani su kao proizvoljni položaji duž rešetke mikrotubula, a ne kao položaji njihovih plus krajeva, jer su oni dinamički. Indeksi u superskriptu

+ i – označavaju desnu, odnosno lijevu stranu vretena. Dužina antiparalelnog preklopa premosnih mikrotubula je konstanta, ℓ_0.

Položaj kinetohora u vremenu t računamo iz ravnoteže viskoznog trenja na kromosom i sila koje nastaju skraćivanjem mikrotubula vezanih za kinetohoru,

$$\xi_{\mathrm{k}} \frac{dx_{\mathrm{k}}^{\pm}}{dt} = F_{\mathrm{k}}^{\pm}. \tag{4.1}$$

Koeficijent trenja na kromosomu je označen s ξ_{k}, dok sila generirana na kinetohori ovisi o brzini kinetohore u odnosu na rešetku kinetohornog mikrotubula te ju opisujemo kao linearnu ovisnost, $F_{\mathrm{k}}^{\pm} = f_{\mathrm{k}}\left(\pm 1 - \frac{v_{\mathrm{k}}^{\pm} - v_{\mathrm{kf}}^{\pm}}{v_{\mathrm{k0}}}\right)$, gdje je sila koja zaustavlja skraćivanje mikrotubula vezanih na kinetohoru u anafazi označena s f_{k}, a brzina slobodnog skraćivanja mikrotubla u odsutstvu sile je v_{k0}. Brzine kojima se mijenjaju položaji praćenih objekata u modelu, računamo kao vremenske derivacije $v_i^{\pm} = dx_i^{\pm}/dt$, gdje je $i = \mathrm{k}, \mathrm{kf}, \mathrm{br}, \mathrm{p}$ (označuje redom kinetohoru, kinetohorni, premosni mikrotubul i pol diobenog vretena).

Gibanje snopa kinetohornih mikrotubula pokreću sile koje generiraju molekularni motori distribuirani duž kinetohornih mikrotubula, $F_{\mathrm{m}}^{\pm}$, te također, sile koje su uzrokovane depolimerizirajućim motorima na polovima diobenog vretena, $F_{\mathrm{pk}}^{\pm}$ i na kinetohorama. Lateralno razmicanje kinetohornih i premosnih mikrotubula koji formiraju antiparalelni preklop, prigušeno je trenjem pasivnih proteina,

$$N_{\mathrm{c}}^{\pm} \xi_{\mathrm{c}} \frac{d\left(x_{\mathrm{kf}}^{\pm} - x_{\mathrm{br}}^{\pm}\right)}{dt} = F_{\mathrm{m}}^{\pm} + F_{\mathrm{pk}}^{\pm} - F_{\mathrm{k}}^{\pm}. \tag{4.2}$$

Broj pasivnih proteina distribuiranih duž paralelnog preklopa kinetohornih i premosnih snopova mikrotubula računamo kao $N_{\mathrm{c}}^{\pm} = \pm n_{\mathrm{c}}\left(x_{\mathrm{p}}^{\pm} - x_{\mathrm{k}}^{\pm}\right)$, gdje je n_{c} linearna gustoća, a $\pm\left(x_{\mathrm{p}}^{\pm} - x_{\mathrm{k}}^{\pm}\right)$ duljina kinetohornog mikrotubula. Parametar ξ_{c} opisuje koeficijent trenja pasivnih proteina. Sila molekularnih motora, koji se nalaze u antiparalelnim preklopima snopova kinetohornih i premosnih mikrotubula, ovisi o relativnoj brzini klizanja kinetohornog snopa u odnosu na premosni snop mikrotubula, $F_{\mathrm{m}}^{\pm} = N_{\mathrm{m}}^{\pm} f_{\mathrm{m}}\left(\pm 1 - \frac{v_{\mathrm{kf}}^{\pm} - v_{\mathrm{br}}^{\mp}}{v_{\mathrm{m}}}\right)$, dok sila generirana na polovima diobenog vretena uslijed depolimerizacije mikrotubula ovisi o relativnoj brzini kinetohornog snopa u odnosu na brzinu pola, $F_{\mathrm{pk}}^{\pm} = f_{\mathrm{p}}\left(\pm 1 - \frac{v_{\mathrm{kf}}^{\pm} - v_{\mathrm{p}}^{\pm}}{v_{\mathrm{p0}}}\right)$. Ovdje je također korištena linearna ovisnost između sile i brzine, gdje su f_{m} i f_{p} sile koje zaustavljaju gibanja te v_{m} i v_{p0} brzine u

odsutstvu sila. Broj molekularnih motora odgovoran za lateralna razmicanja mikrotubula računamo kao $N_{\mathrm{m}}^{\pm} = n_{\mathrm{m}}\left(\ell_0/2 \mp x_{\mathrm{k}}^{\pm}\right)\theta\left(\ell_0/2 \mp x_{\mathrm{k}}^{\pm}\right)$, gdje je n_{m} linearna gustoća motora, a Heaviside funkcija θ osigurava postojanje antiparalelnog preklopa.

Gibanje segmenta premosnih mikrotubula, ponovno, navode sile molekularnih motora raspoređenih u antiparalelnim preklopima premosnih snopova mikrotubula koji hodanjem duž mikrotubula, lateralno razmiču mikrotubule, F_{br}. Također, gibanju premosnih mikrotubula doprinose sile motora u antiparalelnim preklopima premosnih i kinetohornih mikrotubula te na polu diobenog vretena, $F_{\mathrm{pb}}^{\pm}$. Dane sile su uravnotežene viskoznim trenjem uslijed klizanja premosnih mikrotubula relativno u odnosu na kinehorne mikrotubule,

$$N_{\mathrm{c}}^{\pm}\xi_{\mathrm{c}}\frac{d\left(x_{\mathrm{br}}^{\pm} - x_{\mathrm{kf}}^{\pm}\right)}{dt} = \pm F_{\mathrm{br}} - F_{\mathrm{m}}^{\mp} + F_{\mathrm{pb}}^{\pm}. \tag{4.3}$$

Sile generirane u preklopima premosnih mikrotubula ovise o njihovoj relativnoj brzini $F_{\mathrm{br}} = N_{\mathrm{br}} f_{\mathrm{m}}\left(1 - \frac{v_{\mathrm{br}}^{+} - v_{\mathrm{br}}^{-}}{v_{\mathrm{m}}}\right)$. Sila, koju motori pola diobenog vretena vrše na premosni snop mikrotubula, ovisi o relativnoj brzini premosnog snopa u odnosu na brzinu razmicanja polova, $F_{\mathrm{pb}}^{\pm} = f_{\mathrm{p}}\left(\pm 1 - \frac{v_{\mathrm{br}}^{\pm} - v_{\mathrm{p}}^{\pm}}{v_{\mathrm{p0}}}\right)$. Broj molekularnih motora u antiparalelnom preklopu premosnih mikrotubula je $N_{\mathrm{br}} = n_{\mathrm{m}}\ell_0$.

Gibanje polova diobenog vretena nastaje uslijed djelovanja sila, generiranih razmicanjem kinetohornih i premosnih mikrotubula te su te sile uravnotežene viskoznim trenjem na pol diobenog vretena s koeficijentom trenja ξ_{p},

$$\xi_{\mathrm{p}}\frac{dx_{\mathrm{p}}^{\pm}}{dt} = -\left(F_{\mathrm{pk}}^{\pm} + F_{\mathrm{pb}}^{\pm} + F_{\mathrm{pk}}^{\prime\pm} + F_{\mathrm{pb}}^{\prime\pm}\right). \tag{4.4}$$

Sile koje na polove diobenog vretena vrši drugi par snopova kinetornih, $F_{\mathrm{pk}}^{\prime\pm}$ i premosnih, $F_{\mathrm{pb}}^{\prime\pm}$ mikrotubula, analogno zapisujemo tako da jednadžbe (4.1), (4.2) i (4.3) modificiramo dodavanjem jednostrukog navodnika u eksponent svih varijabli pri definiranju sila.

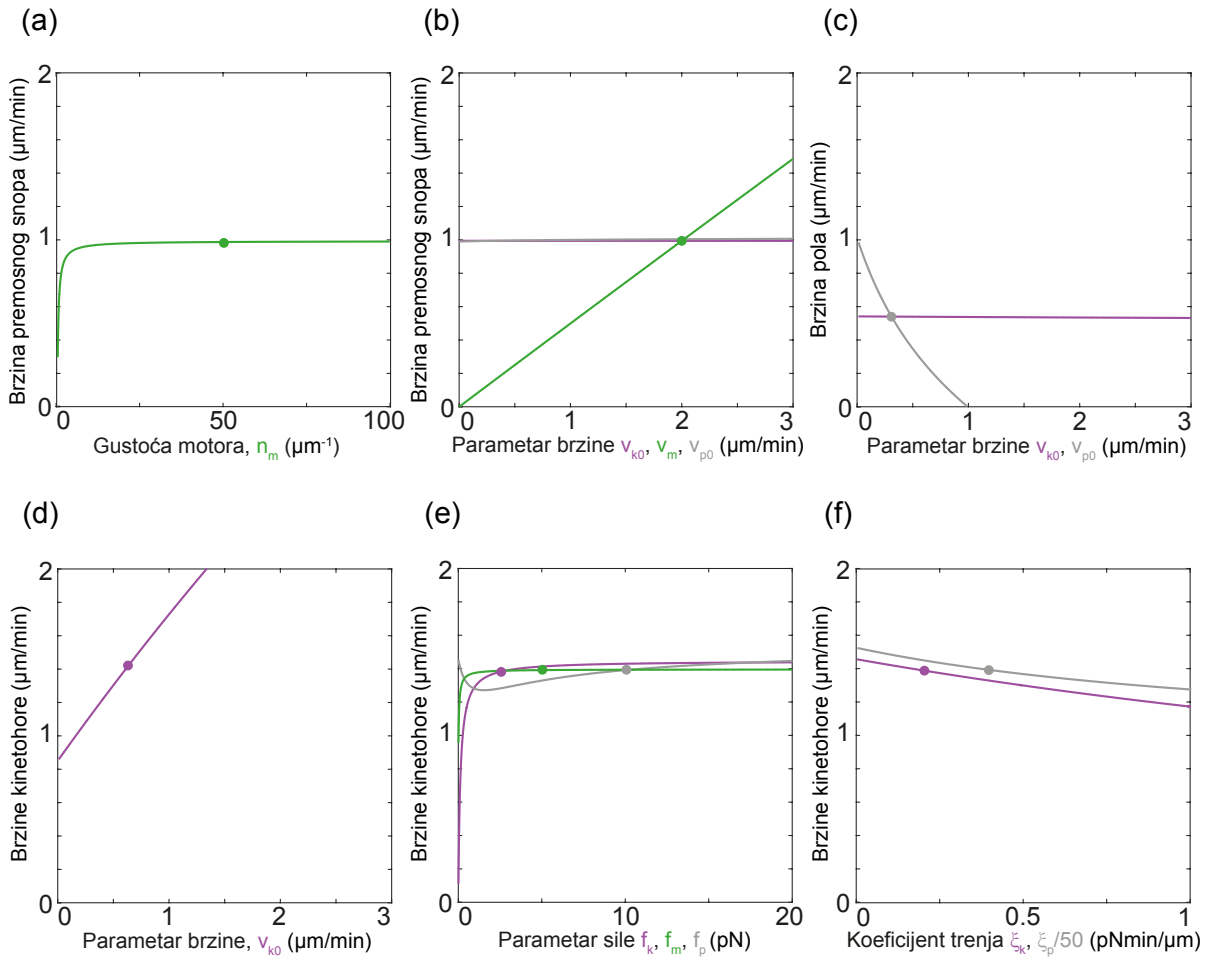
4.3 Izbor vrijednosti parametara

Kako bismo definirali skup parametara relevantan za gibanja unutar staničnog sustava u anafazi, varirali smo parametre modela (Tablica 4.1) krenuvši od biološki najvažnijih te njihovog utjecaja na brzine promatranih objekata u sustavu (Slika 4.4).

Variranjem gustoće molekularnih motora koji razmiču mikrotubule u antiparalelnoj konformaciji, n_{m}, zaključujemo da je iznad vrijednosti $n_{\mathrm{m}} = 10\ \mu m^{-1}$ brzina klizanja premosnih mikrotubula gotovo konstantna te potom, za konačan skup parametara, odabiremo veći iznos (Slika 4.4.a). Istraživanjem utjecaja parametara v_{m}, v_{p0} i v_{k0}, zaključujemo da je jedini parametar sa značajnim efektom na brzinu klizanja premosnih mikrotubula parametar v_{m} (Slika 4.4.b). Stoga, vrijednost parametra v_{m} postavljamo tako da konačna numerička rješenja modela reproduciraju mjerene brzine klizanja premosnih mikrotubula. Na sličan način, slobodna brzina depolimerizacije mikrotubula na polu diobenog vretena, v_{p0} određena je tako da rješenja reproduciraju mjerenu brzinu gibanja polova (Slika 4.4.c) dok je slobodna brzina depolimerizacije mikrotubula kod kinetohore, v_{k0}, određena tako da rješenja reproduciraju mjerenu brzinu gibanja kinetohora tijekom razmicanja (Slika 4.4.d). Parametri koji opisuju sile zaustavljanja gibanja, f_{m}, f_{p} i f_{k} ne utječu značajno na brzinu kinetohora (Slika 4.4.e), tako su vrijednosti f_{m} i f_{k} preuzete iz literature, dok smo za vrijednost f_{p} odabrali sličan iznos. Parametri koji opisuju trenje kromosoma i polova diobenog vretena u citoplazmi, ξ_{k} i ξ_{p}, nemaju značajan utjecaj na brzine kinetohora tijekom anafaze (Slika 4.4.f), stoga je vrijednost ξ_{k} preuzeta iz literature, dok smo za ξ_{p} odabrali 100 puta veću vrijednost kako bi skalirali trenje s veličinom polova diobenog vretena. Vrijednost produkta parametara koji opisuju trenje pasivnih proteina, $\xi_{\mathrm{c}} n_{\mathrm{c}}$, odabrana je kako bi savladala trenje kromosoma u citoplazmi, tj. tako da vrijedi $\pm\left(x_{\mathrm{p}}^{\pm} - x_{\mathrm{k}}^{\pm}\right) \cdot \xi_{\mathrm{c}} n_{\mathrm{c}} \gg \xi_{\mathrm{k}}$.

Tablica 4.1: *Vrijednosti parametara korištene u poglavlju 4.*

	Parametar	**Vrijednost**	**Izvor**
ξ_{k}	Trenje na kromosom	$0.2\ pNmin/\mu m$	Marshall *et al*., 2001
v_{k0}	Slobodna brzina depolimerizacije plus kraja mikrotubula	$0.6\ \mu m/min$	procijenjeno
f_{k}	Sila zaustavljanja depolimerizacije kod kinetohore	$3\ pN$	Akiyoshi *et al.*, 2010
v_{m}	Slobodna brzina motora koji razmiču mikrotubule	$2\ \mu m/min$	Cameron *et al.,* 2006
f_{m}	Sila zaustavljanja motora koji razmiču mikrotubule	$5\ pN$	Valentine *et al.*, 2006
n_{m}	Gustoća motora	$50\ \mu m^{-1}$	procijenjeno
ℓ_0	Duljina antiparalelnog preklopa premosnih mikrotubula	$4\ \mu m$	Kajtez *et al.*, 2016
v_{p0}	Slobodna brzina depolimerizacije na polu	$0.3\ \mu m/min$	procijenjeno
f_{p}	Sila zaustavljanja depolimerizacije kod pola	$10\ pN$	procijenjeno
ξ_{p}	Trenje na pol	$20\ pNmin/\mu m$	procijenjeno
$\xi_{\mathrm{c}} n_{\mathrm{c}}$	Koeficijent trenja pasivnih vezivnih proteina	$1\ pNmin/\mu m^2$	procijenjeno

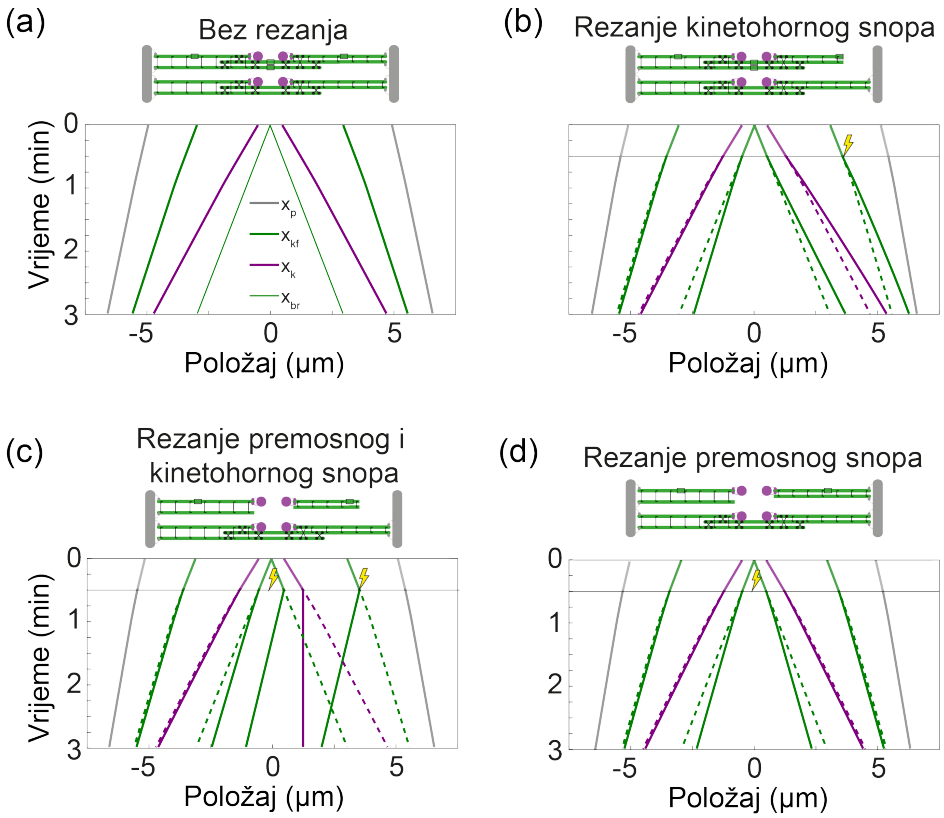


Slika 4.4: *Izbor vrijednosti parametara za poglavlje 4.*

4.4 Rezultati modela za razdvajanje kinetohora

Za početne uvjete dane u (Slika 4.3), i parametre u (Tablica 4.1), numerička rješenja modela pokazuju separaciju oba para kinetohora u vremenu (Slika 4.5.a). Premosni mikrotubuli kližu jedan u odnosu na drugog s brzinom koja odgovara slobodnoj brzini molekularnih motora. Snopovi kinetohornih mikrotubula gibaju se brzinama koje su po iznosu slične brzinama premosnih mikrotubula. Polovi diobenog vretena se razmiču, no s manjom brzinom, u usporedbi s ostalim segmentima vretena. Kvantitativno slaganje s eksperimentalno mjerenim vrijednostima brzina postignuto je odabirom slobodnih parametara v_{m}, v_{p0} i v_{k0}, opisanim u prethodnom

poglavlju. Rješenja ovog kompletnog modela dobro opisuju separaciju genetskog materijala u anafazi.



Slika 4.5: *Gore: shema modela za pojedini promatrani slučaj. Dolje: Položaji kinetohora, segmenata snopova kinetohornih i premosnih vlakana i polova kao funkcije vremena za parametre iz (Tablica 4.1). Pune i iscrtkane linije odgovaraju gornjem, odnosno donjem vlaknu. a) Rješenja potpunog modela. b) Rješenja modificiranog modela u kojem su sile gornjeg desnog snopa na pol izjednačene s nulom u* $t = 0.5\ min$. *c) Rješenja modificiranog modela u kojem su sile kinetohornih i premosnih snopova u gornjem segmentu vretena izjednačene s nulom u* $t = 0.5\ min$. *d) Rješenja modificiranog modela u kojem su sile premosnih snopova u gornjem segmentu vretena izjednačene s nulom u* $t = 0.5\ min$.

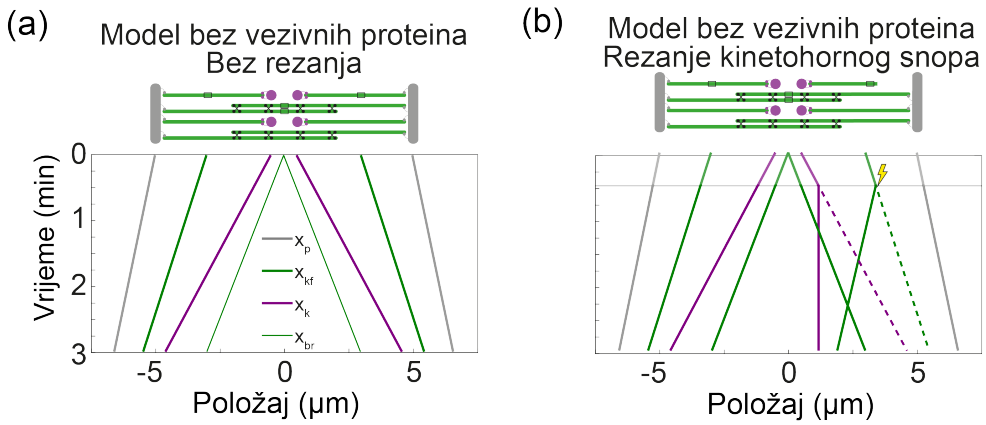
Nadalje, ovdje formuliran model ima potencijal otkriti mehanizme koji navode separaciju kinetohora u eksperimentima laserskog rezanja. Kako bi proizveli numeričke rezultate koje možemo usporediti s rezultatima eksperimenata laserskog rezanja snopa kinetohornih

mikrotubula podalje od para kinetohora, modificirali smo model izjednačavanjem sila na pol diobenog vretena koje uzrokuju mikrotubuli gornjeg para kinetohornih i premosnih mikrotubula s nulom, $F_{\mathrm{pk}}^{\pm} = F_{\mathrm{pb}}^{\pm} = 0$, te definiranjem duljine desnog gornjeg kinetohornog snopa, $x_{\mathrm{kf}}^{+} - x_{\mathrm{k}}^{+}$ u vremenu $t = 0.5\,min$ koje odgovara trenutku lasersog rezanja. Numerička rješenja za slučaj ovakve perturbacije u sustavu pokazuju da se kinetohore i kinetohorni i premosni snopovi mikrotubula gibaju sa sličnim brzinama, neovisno o tome da li kinetohorni snopovi interagiraju s polom diobenog vretena ili ne (usporedite iscrtkane i pune linije na (Slika 4.5.b) koje predstavljaju gornje odnosno donje vlakno). Rezultati simulacije laserskog rezanja u modelu su u slaganju s kretanjima kinetohora uočenima u eksperimentima (Slika 4.1). Dodatno, naš model može dati rezultate koje možemo usporediti s eksperimentima dvostrukog laserskog rezanja, u kojima je uz kinetohorni snop dalje od para kinetohora, prerezan i snop pripadajućih premosnih mikrotubula što jednostavno postižemo izjednačavanjem sila u antiparalelnim preklopima s nulom, $F_{\mathrm{br}} = F_{\mathrm{m}}^{\pm} = 0$. U tom slučaju, numerički rezultati pokazuju da se desna gornja kinetohora ne giba te je taj rezultat u skladu s eksperimentima dvostrukog laserskog rezanja (Slika 4.5.c i 4.2).

Posljednji eksperimentalni slučaj koji je moguće analizirati našim modelom, je eksperiment laserskog rezanja svih snopova premosnih mikrotubula. U našem modelu, izjednačavanjem sila u antiparalelnim preklopima mikrotubula u gornjim snopovima s nulom, $F_{\mathrm{br}} = F_{\mathrm{m}}^{\pm} = 0$ u trenutku $t = 0.5\,min$, dobit ćemo rezultate koji pokazuju da su gibanja svih objekata slična onima u nemodificiranom modelu (Slika 4.5.d i 4.5.a). Dobiveni rezultati kvalitativno se slažu s gibanjima kinetohora prema nasuprotnim polovima u vretenu u kojem su laserski prerezani svi premosni mikrotubuli u središtu diobenog vretena (Vukušić *et al*., 2018). Naš teorijski model ne može reproducirati eksperimentalno opaženo izraženo usporavanje separacije polova s obzirom da je u eksperimetima prerezana većina premosnih snopova, dok su u našem modelu sile u jednom od dva premosna snopa izjednačene s nulom.

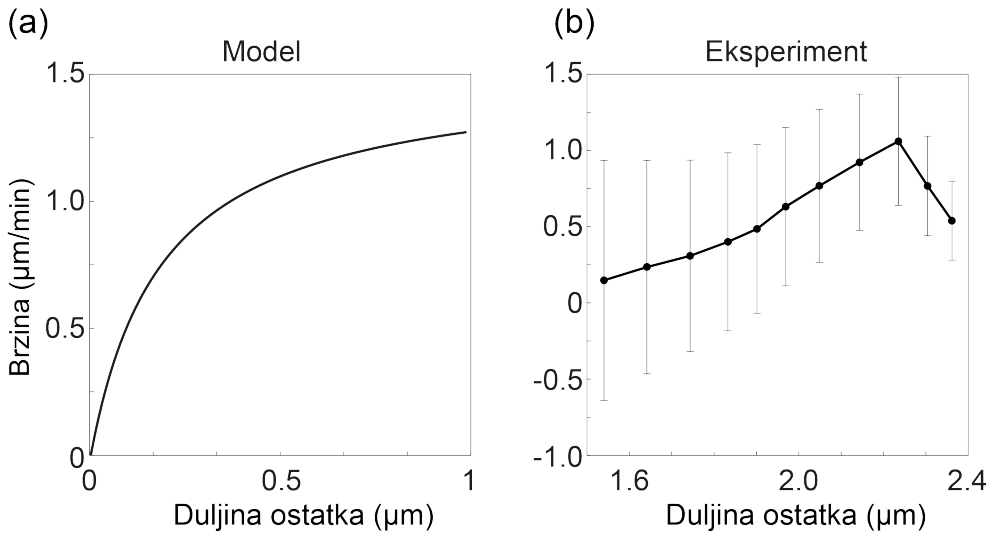
Usporedba s prijašnjim modelima za anafazu. Za razliku od dosad prihvaćenih modela za anafazu (Brust-Mascher *et al.*, 2004; Civelekoglu-Scholey *et al*., 2006; Cytrynbaum *et al.*, 2003; Wollman *et al*., 2008) glavni novi sastojak u našem modelu je veza između kinetohornih snopova i dosad teorijski neistraženih premosnih snopova mikrotubula. Kako bi istražili važnost te veze između snopova mikrotubula, modificirali smo model izjednačavajući silu molekularnih motora u antiparalelnim preklopima s nulom, $F_{\mathrm{m}}^{\pm} = 0$ te smo uklonili pasivne proteine, $N_{\mathrm{c}}^{\pm} = 0$. Sada,

dobiveni numerički rezultati odgovaraju rezultatima kompletnog modela (Slika 4.6.a i 4.5.a). Međutim, ako u ovom sustavu, bez veze između snopova mikrotubula, pokušamo reproducirati eksperimente laserskog rezanja (dodatno postavimo $F_{\mathrm{pk}}^{\pm} = F_{\mathrm{pb}}^{\pm} = 0$ u trenutku $t = 0.5\,min$), nećemo uočiti eksperimentalno opaženu separaciju kinetohora nakon uklanjanja sila uzrokovanih polom diobenog vretena, (Slika 4.6.b). Zaključujemo da je veza ostvarena putem molekularnih motora i pasivnih proteina u preklopima kinetohornih i premosnih snopova mikrotubula važan mehanizam bez kojeg ne možemo objasniti separaciju kinetohora opaženu u eksperimentima laserskog rezanja.



Slika 4.6: *Pune i iscrtkane linije odgovaraju gornjem, odnosno donjem vlaknu. a) Rješenja modela bez vezivnih proteina između snopova mikrotubula. b) Rješenja modificiranog modela bez pasivnih proteinskih veza između snopova kinetohornih i premosnih snopova. Dodatno, sile na pol koje generiraju gornji snopovi su izjednačene s nulom u* $t = 0.5\,min$.

Predikcija modela. Naš model daje neovisnu predikciju za gibanja kinetohora u eksperimentima laserskog rezanja kinetohornog snopa mikrotubula. Kada setiramo sile u desnom gornjem kinetohornom snopu na nulu, brzina desne kinetohore raste s duljinom ostatka kinetohornog snopa, $x_{\mathrm{kf}}^{+} - x_{\mathrm{k}}^{+}$, (Slika 4.7.a).



Slika 4.7: *a) Brzina desne kinetohore prikazana kao funkcija duljine ostatka kinetohornog snopa. b) Eksperimentalna mjerenja pertubiranog segmenta vretena. Brzina središnje točke između kinetohora u ovisnosti o duljini ostatka kinetohornog snopa. Srednja vrijednost* $\pm$ *SEM.*

Kako bi eksperimentalno testirali tu predikciju, iskoristili smo podatke iz eksperimenta laserskog rezanja vanjskog kinetohornog snopa te izmjerili duljinu ostatka snopa i brzinu gibanja kinetohore, (Slika 4.7.b). Sukladno predviđanjima modela, opaženo je da brzina kinetohore raste s duljinom ostatka kinetohornog snopa mikrotubula. U eksperimentima, brzina postaje jednaka nuli za konačne duljine ostatka snopa vjerojatno jer eksperimentalno znamo da kinetohorni snop mikrotubula ostvaruje vezu s premosnim snopom mikrotubula na udaljenosti od $\sim 1\ \mu m$ od same kinetohore (Kajtez *et al*., 2016; Milas and Tolić, 2016), dok to geometrijsko svojstvo nije uključeno u ovaj model. Rezultati ovdje opisanih eksperimenata i teorijskog modela vode na zaključak da je lateralno razmicanje unutar antiparalelnih preklopa premosnih mikrotubula, koji su povezani s kinetohornim mikrotubulima duž njihovih paralelnih preklopa putam pasivnih proteina, uzrok pomicanja kinetohornih mikrotubula prema polovima diobenog vretena te time i separacije kromosoma u anafazi.

5 Zaključak i diskusija

U prvom dijelu ovog rada, razmatrali smo stohastička gibanja kinetohora u stanicama kvasaca u metafazi. Ovdje definirani model zajedno s eksperimentima pokazuje da su motori kinezina-8 potrebni za centriranje kinetohora u metafaznoj ravnini, dok je ovisnost učestalosti spasa o sili nužna za generiranje oscilacija. Centriranje kinetohora posljedica je akumulacije motora na plus kraju mikrotubula u ovisnosti o duljini mikrotubula (Varga *et al.,* 2006), a koja rezultira učestalijom katastrofom dužih mikrotubula (Tischer *et al.,* 2009, 2010) i time manje frekventnim kretanjima kinetohora izvan središnje trećine diobenog vretena. Za razliku od dosad korištenih simulacija koje istražuju gibanja kinetohora u metafaznom vretenu kvasaca (Gay *et al.,* 2012; Mary *et al.,* 2015; Gergely *et al.,* 2016) i u ljudskim stanicama (Civelekoglu-Scholey *et al.,* 2006, 2013; Liu *et al.,* 2008; Armond *et al.,* 2015; Banigan *et al.,* 2015), pri definiranju našeg modela korišten je Langevinov pristup opisu stohastičke prirode dinamičke nestabilnosti mikrotubula. Prijašnji modeli za opis stohastičke dinamike plus kraja mikrotubula koriste Monte Carlo simulacije. Korištenjem ovdje opisanog Langevinovog pristupa, pokazali smo da će se kinetohore gibati u blizini središta metafazne ravnine u širokom rasponu parametara samo ako dinamiku plus kraja mikrotubula opišemo pomoću stohastičkih članova. Na sličan način, stohastička priroda sustava osigurava robustnost dinamičkog ponašanja u igrama poput kamen-škare-papir (Reichenbach *et al.,* 2007). U našem sustavu, opažena robustnost u gibanju kinetohora sugerira da definicija našeg modela daje potencijalno objašnjenje kako biološki sustav s visokom varijabilnošću ostvaruje tipična gibanja kinetohora u središtu metafazne ravnine.

Kako je utvrđeno da je pozicioniranje kromosoma u ekvatorijalnu ravninu diobenog vrtetena nužno kako bi se spriječilo postojanje dislociranih kromosoma koji vode na abnormalnu reformaciju jezgrine ovojnice (Fonseca *et* al., 2019), naš minimalan model za kretanja kinetohora u metafaznom vretenu kvasaca u idućem je poglavlju proširen mehanizmima koje uzrokuju premosni mikrotubuli, koji su pasivnim proteinima povezani duž lateralnih preklopa s kinetohornim snopovima, kako bi se teorijski istražili potencijalni mehanizmi pozicioniranja kromosoma. U ovom slučaju, kinetohorna vlakna sastoje se od 10 mikrotubula te je sada utjecaj Langevinovog šuma manji i oblik oscilacija je pravilniji, čime su reproducirana metafazna gibanja kinetohora u ljudskim stanicama (Stumpff *et al.*, 2012) i pozicioniranje kromosoma u središte diobenog vretena. Model prezentiran ovdje predviđa da stabilni antiparalelni preklopi premosnih mikrotubula vode pozicioniranje kinetohora u središte metafazne ravnine te je time

okarakteriziran dodatni mehanizam koji uz dosad poznati mehanizam centriranja putem motora kinezina-8, osigurava robusno pozicioniranje kromosoma unutar diobenog vretena.

Posljednji rezultati teorijskog rada prezentiranog ovdje fokusiraju se na separaciju kromosoma tijekom anafaze. Pokazali smo da sile guranja generirane unutar preklopa premosnih mikrotubula razdvajaju kromosome neovisno od veze s polovima diobenog vretena. Taj rezultat je neočekivan prema dosadašnjim modelima separacije kromosoma u kojima svi procesi koji doprinose separaciji kromosoma moraju biti direktno ili indirektno vezani za pol diobenog vretena (Civelekoglu-Scholey *et al*., 2006; Wollman *et al*., 2008). Eksperimenti ukratko prezentirani u ovom radu pokazuju upravo suprotno, tj. sugeriraju da sile nužne za separaciju genetskog materijala moraju nastati unutar samog diobenog vretena, potvrđujući nužnost premosnog snopa mikrotubula koji će biti pokretač separacije kromosoma u anafazi. Uz motorne proteine, naš model uključuje pasivne proteinske veze između premosnih i kinetohornih snopova; kao potencijalni kandidati za taj mehanizam postoje proteini *"mesh"* (Nixon *et al*., 2015), a kao pasivna veza u antiparalelnom dijelu preklopa snopova postoji protein PRC1 (Kajtez *et al.,* 2016; Polak *et al*., 2017) te se njihova uloga kao i uloga brojnih aktivnih molekularnih motora u dinamičkim procesima unutar vretena još uvijek ispituje.

Ovaj rad pokazuje kako sile nastale pomoću veza između kinetohornih i dosad neistraženih premosnih mikrotubula u kombinaciji sa silama na dinamičkim plus krajevima mikrotubula navode oscilatorna kretanja kromosoma tijekom metafaze u stanicama kvasaca i ljudskim stanicama te pozicioniranje i separaciju kromosoma u ljudskim stanicama, neovisnu od doprinosa s polova diobenog vretena.

6 Literatura

Aist, J.R., Liang, H., Berns, M.W. (1993). Astral and spindle forces in PtK2 cells during anaphase B: a laser microbeam study. J Cell Sci 104 (Pt 4), 1207- 1216

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

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. (1994). Molecular Biology of the Cell. Garland, New York.

Amaro, A.C., Samora, C.P., Holtackers, R., Wang, E., Kingston, I.J., Alonso, M., Lampson, M., McAinsh, A.D., and Meraldi, P. (2010). Molecular control of kinetochore-microtubule dynamics and chromosome oscillations. Nat Cell Biol 12, 319-329.

Ananthanarayanan, V., Schattat, M., Vogel, S.K., Krull, A., Pavin, N., and Tolić-Norrelykke, I.M. (2013). Dynein motion switches from diffusive to directed upon cortical anchoring. Cell 153, 1526-1536.

Armond, J.W., Harry, E.F., McAinsh, A.D., and Burroughs, N.J. (2015). Inferring the Forces Controlling Metaphase Kinetochore Oscillations by Reverse Engineering System Dynamics. PLoS Comput Biol 11, e1004607.

Banigan, E.J., Chiou, K.K., Ballister, E.R., Mayo, A.M., Lampson, M.A., and Liu, A.J. (2015). Minimal model for collective kinetochore-microtubule dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 12699-12704.

Blackwell, R., Sweezy-Schindler, O., Edelmaier, C., Gergely, Z.R., Flynn, P.J., Montes, S., Crapo, A., Doostan, A., McIntosh, J.R., Glaser, M.A., and Betterton, M.D. (2017). Contributions of Microtubule Dynamic Instability and Rotational Diffusion to Kinetochore Capture. Biophys J 112, 552-563.

Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G., Kwon, M., Mogilner, A., Scholey, J.M. (2004). Model for anaphase B: role of three mitotic motors in a switch from poleward flux to spindle elongation. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 15938-15943

Cameron, L.A., Yang, G., Cimini, D., Canman, J.C., Kisurina-Evgenieva, O., Khodjakov, A., Danuser, G., Salmon, E.D. (2006). Kinesin 5-independent poleward flux of kinetochore microtubules in PtK1 cells. J Cell Biol 173, 173–179.

Cassimeris, L., Becker, B., and Carney, B. (2009). TOGp regulates microtubule assembly and density during mitosis and contributes to chromosome directional instability. Cell Motil Cytoskeleton 66, 535-545.

Chacon, J.M., Mukherjee, S., Schuster, B.M., Clarke, D.J., and Gardner, M.K. (2014). Pericentromere tension is self-regulated by spindle structure in metaphase. J Cell Biol 205, 313-324.

Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. Nat Rev Mol Cell Biol 9, 33-46.

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

Civelekoglu-Scholey, G., Sharp, D.J., Mogilner, A., and Scholey, J.M. (2006). Model of chromosome motility in Drosophila embryos: adaptation of a general mechanism for rapid mitosis. Biophys J 90, 3966-3982.

Coppin, C.M., Pierce, D.W., Hsu, L., Vale, R.D. (1997). The load dependence of kinesin's mechanical cycle. Proc Natl Acad Sci 94, 8539-8544

Courtheoux, T., Gay, G., Reyes, C., Goldstone, S., Gachet, Y., and Tournier, S. (2007). Dynein participates in chromosome segregation in fission yeast. Biol Cell 99, 627-637.

Cytrynbaum, E.N., Scholey, J.M., Mogilner, A. (2003). A force balance model of early spindle pole separation in Drosophila embryos. Biophys J 84, 757-769

Ding, R., McDonald, K.L., and McIntosh, J.R. (1993). Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, Schizosaccharomyces pombe. The Journal of cell biology 120, 141-151.

Dogterom, M., and Yurke, B. (1997). Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. Science 278, 856-860.

Dumont, S., Salmon, E.D., and Mitchison, T.J. (2012). Deformations within moving kinetochores reveal different sites of active and passive force generation. Science 337, 355-358.

Erent, M., Drummond, D.R., and Cross, R.A. (2012). S. pombe kinesins-8 promote both nucleation and catastrophe of microtubules. PLoS One 7, e30738.

Ferenz, N.P., Paul, R., Fagerstrom, C., Mogilner, A. and Wadsworth, P. (2009). Dynein antagonizes Eg5 by crosslinking and sliding antiparallel microtubules. Curr Biol 19, 1893-1838

Fonseca, C.L., Malaby, H.L.H., Sepaniac, L.A., Martin, W., Byers, C., Czechanski, A., Messinger, D., Tang, M., Ohi, R., Reinholdt, L.G. and Stumpff, J. (2019). Mitotic chromosome alignment ensures mitotic fidelity by promoting interchromosomal compaction during anaphase. J Cell Biol, 218 (4): 1148–1163.

Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S., and Yanagida, M. (1993). Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. J Cell Biol 121, 961-976.

Gachet, Y., Reyes, C., Courtheoux, T., Goldstone, S., Gay, G., Serrurier, C., and Tournier, S. (2008). Sister kinetochore recapture in fission yeast occurs by two distinct mechanisms, both requiring Dam1 and Klp2. Mol Biol Cell 19, 1646-1662.

Garcia, M.A., Koonrugsa, N., and Toda, T. (2002). Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. Curr Biol 12, 610-621.

Gardner, M.K., Odde, D.J., and Bloom, K. (2008). Kinesin-8 molecular motors: putting the brakes on chromosome oscillations. Trends Cell Biol 18, 307-310.

Gardner, M.K., Pearson, C.G., Sprague, B.L., Zarzar, T.R., Bloom, K., Salmon, E.D., and Odde, D.J. (2005). Tension-dependent regulation of microtubule dynamics at kinetochores can explain metaphase congression in yeast. Mol Biol Cell 16, 3764-3775.

Gay, G., Courtheoux, T., Reyes, C., Tournier, S., and Gachet, Y. (2012). A stochastic model of kinetochore-microtubule attachment accurately describes fission yeast chromosome segregation. J Cell Biol 196, 757-774.

Gergely, Z.R., Crapo, A., Hough, L.E., McIntosh, J.R., and Betterton, M.D. (2016). Kinesin-8 effects on mitotic microtubule dynamics contribute to spindle function in fission yeast. Mol Biol Cell 27, 3490-3514.

Glunčić, M., Maghelli, N., Krull, A., Krstić, V., Ramunno-Johnson, D., Pavin, N., and Tolić, I.M. (2015). Kinesin-8 motors improve nuclear centering by promoting microtubule catastrophe. Phys Rev Lett 114, 078103.

Grishchuk, E.L., Molodtsov, M.I., Ataullakhanov, F.I., and McIntosh, J.R. (2005). Force production by disassembling microtubules. Nature 438, 384-388.

Grissom, P., Fielder, T., Grishchuk, E., Nicastro, D., West, R.R., and Mcintosh, R.J. (2008). Kinesin-8 from Fission Yeast: a Heterodimeric, Plus End-Directed Motor that Can Couple Microtubule Depolymerization to Cargo Movement. Mol Biol Cell.

Gupta, M.L., Jr., Carvalho, P., Roof, D.M., and Pellman, D. (2006). Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. Nat Cell Biol 8, 913-923.

Hafner, J., Mayr, M.I., Mockel, M.M., and Mayer, T.U. (2014). Pre-anaphase chromosome oscillations are regulated by the antagonistic activities of Cdk1 and PP1 on Kif18A. Nat Commun 5, 4397.

Hagan, I., and Yanagida, M. (1992). Kinesin-related cut7 protein associates with mitotic and meiotic spindles in fission yeast. Nature 356, 74-76.

Hough, L.E., Schwabe, A., Glaser, M.A., McIntosh, J.R., and Betterton, M.D. (2009). Microtubule depolymerization by the Kinesin-8 motor Kip3p: a mathematical model. Biophysical journal 96, 3050-3064.

Howard, J. (2001). Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. Sinauer Associates

Jagrić, M., Risteski, P., Martinčić, J., Milas, A., Tolić, I.M. (2019). Optogenetic control of PRC1 reveals its role in kinetochore alignment at the metaphase plate. bioRxiv, doi.org/10.1101/865394

Jaqaman, K., King, E.M., Amaro, A.C., Winter, J.R., Dorn, J.F., Elliott, H.L., McHedlishvili, N., McClelland, S.E., Porter, I.M., Posch, M., Toso, A., Danuser, G., McAinsh, A.D., Meraldi, P., and Swedlow, J.R. (2010). Kinetochore alignment within the metaphase plate is regulated by centromere stiffness and microtubule depolymerases. The Journal of Cell Biology 188, 665-679.

Joglekar, A.P., and Hunt, A.J. (2002). A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements. Biophys J 83, 42-58.

Johann, D., Erlenkämper, C., and Kruse, K. (2012). Length Regulation of Active Biopolymers by Molecular Motors. Phys Rev Lett 108, 258103.

Kajtez, J., Solomatina, A., Novak, M., Polak, B., Vukušić, K., Rudiger, 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., and Tolić, I.M. (2016). Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores. Nat Commun 7, 10298.

Kalinina, I., Nandi, A., Delivani, P., Chacon, M.R., Klemm, A.H., Ramunno-Johnson, D., Krull, A., Lindner, B., Pavin, N., and Tolić-Norrelykke, I.M. (2013). Pivoting of microtubules around the spindle pole accelerates kinetochore capture. Nat Cell Biol 15, 82-87.

Kittel, C. (1958). Elementary statistical physics. John Wiley &Sons, Inc.

Kolomeisky, A.B., and Fisher, M.E. (2007). Molecular motors: a theorist's perspective. Annu Rev Phys Chem 58, 675-695.

Kuznetsov, Y.A. (1998). Elements of applied bifurcation theory. Springer, 2nd ed. Berlin.

Lansky, Z., Braun, M., Ludecke, A., Schlierf, M., ten Wolde, P.R., Janson, M.E., and Diez, S. (2015). Diffusible crosslinkers generate directed forces in microtubule networks. Cell 160, 1159-1168.

Leduc, C., Padberg-Gehle, K., Varga, V., Helbing, D., Diez, S., and Howard, J. (2012). Molecular crowding creates traffic jams of kinesin motors on microtubules. Proc Natl Acad Sci USA 109, 6100-6105.

Levesque, A.A., and Compton, D.A. (2001). The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. J Cell Biol 154, 1135-1146.

Li, X., and Nicklas, R.B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. Nature 373, 630-632.

Liu, J., Desai, A., Onuchic, J.N., and Hwa, T. (2008). An integrated mechanobiochemical feedback mechanism describes chromosome motility from prometaphase to anaphase in mitosis. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 13752-13757.

Loiodice, I., Staub, J., Setty, T.G., Nguyen, N.P., Paoletti, A., and Tran, P.T. (2005). Ase1p organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. Mol Biol Cell 16, 1756-1768.

Maiato, H., Lince-Faria, M. (2010). The perpetual movements of anaphase. Cell Mol Life Sci 67, 2251-2269 (2010).

Marsden, J. E., McCracken M. (1976). The Hopf bifurcation and its applications. Springer, New York.

Marshall, W.F., Marko, J.F., Agard, D.A., Sedat, J.W. (2001). Chromosome elasticity and mitotic polar ejection force measured in living Drosophila embryos by four-dimensional microscopy-based motion analysis. Curr Biol, 11, 569–578.

Mary, H., Fouchard, J., Gay, G., Reyes, C., Gauthier, T., Gruget, C., Pecreaux, J., Tournier, S., and Gachet, Y. (2015). Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations. J Cell Sci 128, 3720-3730.

Mayr, M.I., Hummer, S., Bormann, J., Gruner, T., Adio, S., Woehlke, G., and Mayer, T.U. (2007). The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. Curr Biol 17, 488-498.

McDonald, K.L., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., and McIntosh, J.R. (1992). Kinetochore microtubules in PTK cells. The Journal of Cell Biology 118, 369-383.

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

Melbinger, A., Reese, L., and Frey, E. (2012). Microtubule length regulation by molecular motors. Phys Rev Lett 108, 258104.

Milas, A., and Tolić, I.M. (2016). Relaxation of interkinetochore tension after severing of a k-fiber depends on the length of the k-fiber stub. Matters (Zür). http://dx.doi.org/10.19185/matters.201603000025.

Mitchison, T.J. (1989). Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. J Cell Biol 109, 637-652

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

Musacchio, A. and Desai, A. (2017). A molecular view of kinetochore assembly and function. Biology 6(1):5

Nabeshima, K., Nakagawa, T., Straight, A.F., Murray, A., Chikashige, Y., Yamashita, Y.M., Hiraoka, Y., and Yanagida, M. (1998). Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle. Mol Biol Cell 9, 3211-3225.

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

Nixon, F.M., Honnor, T.R., Clarke, N.I., Starling, G.P., Beckett, A.J., Johansen, A.M., Brettschneider, J.A., Prior, I.A., and Royle, S.J. (2017). Microtubule organization within mitotic spindles revealed by serial block face scanning EM and image analysis. J Cell Sci *130*, 1845–1855.

Polak, B., Risteski, P., Lesjak, S., Tolić, I.M. (2016). PRC1-labeled microtubule bundles and kinetochore pairs show one-to-one association in metaphase. EMBO Rep

Reese, L., Melbinger, A., and Frey, E. (2011). Crowding of molecular motors determines microtubule depolymerization. Biophysical journal 101, 2190-2200.

Reichenbach, T., Mobilia, M., and Frey, E. (2007). Mobility promotes and jeopardizes biodiversity in rock-paper-scissors games. Nature 448, 1046-1049.

Sagolla, M.J., Uzawa, S., and Cande, W.Z. (2003). Individual microtubule dynamics contribute to the function of mitotic and cytoplasmic arrays in fission yeast. J Cell Sci 116, 4891-4903.

Saxton, W.M., McIntosh, J.R. (1987). Interzone microtubule behavior in late anaphase and telophase spindles. J Cell Biol 105, 875-886

Schoch, C.L., Aist, J.R., Yoder, O.C., and Gillian Turgeon, B. (2003). A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. Fungal Genet Biol 39, 1-15.

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

Skibbens, R.V., Skeen, V.P., and Salmon, E.D. (1993). Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. J Cell Biol 122, 859-875.

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

Strogatz, S.H. (1994) Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry and engineering. Perseus Books Publishing, L.L.C.

Stumpff, J., von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C., and Wordeman, L. (2008). The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. Dev Cell 14, 252-262.

Stumpff, J., Wagenbach, M., Franck, A., Asbury, C.L., and Wordeman, L. (2012). Kif18A and chromokinesins confine centromere movements via microtubule growth suppression and spatial control of kinetochore tension. Dev Cell 22, 1017-1029.

Sunko, D.K. (2011). Statistička fizika i termodinamika.

Svoboda, K., Block, S.M. (1994). Force and velocity measured for single kinesin molecules. Cell 77, 773-784

Syrovatkina, V., Fu, C., and Tran, P.T. (2013). Antagonistic spindle motors and MAPs regulate metaphase spindle length and chromosome segregation. Curr Biol 23, 2423-2429.

Tischer, C., Brunner, D., and Dogterom, M. (2009). Force- and kinesin-8-dependent effects in the spatial regulation of fission yeast microtubule dynamics. Mol Syst Biol 5, 250.

Tischer, C., Ten Wolde, P.R., and Dogterom, M. (2010). Providing positional information with active transport on dynamic microtubules. Biophys J 99, 726-735.

Tolić, I.M. (2017). Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. Eur Biophys J 47: 191-203.

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

Tolić-Norrelykke, I.M. (2010). Force and length regulation in the microtubule cytoskeleton: lessons from fission yeast. Curr Opin Cell Biol 22, 21-28.

Unsworth, A., Masuda, H., Dhut, S., and Toda, T. (2008). Fission Yeast Kinesin-8 Klp5 and Klp6 Are Interdependent for Mitotic Nuclear Retention and Required for Proper Microtubule Dynamics. Mol Biol Cell.

Valentine, M.T., Fordyce, P.M., Krzysiak, T.C., Gilbert, S.P., Block, S.M. (2006). Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro. Nat Cell Biol 8, 470–476.

Van Kampen, N.G. (1992). Stochastic Processes in Physics and Chemistry. Elsevier Science: Amsterdam.

Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A.A., Tanaka, T.U., and Howard, J. (2006). Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. Nat Cell Biol 8, 957-962.

Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S., and Howard, J. (2009). Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. Cell 138, 1174-1183.

Vladimirou, E., McHedlishvili, N., Gasic, I., Armond, J.W., Samora, C.P., Meraldi, P., and Mcainsh, A.D. (2013). Nonautonomous movement of chromosomes in mitosis. Dev Cell 27, 60-71.

Vogel, S.K., Raabe, I., Dereli, A., Maghelli, N., and Tolić-Norrelykke, I. (2007). Interphase microtubules determine the initial alignment of the mitotic spindle. Curr Biol 17, 438-444.

Volkov, V.A., Zaytsev, A.V., Gudimchuk, N., Grissom, P.M., Gintsburg, A.L., Ataullakhanov, F.I., McIntosh, J.R., and Grishchuk, E.L. (2013). Long tethers provide high-force coupling of the Dam1 ring to shortening microtubules. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 7708-7713.

Vukušić, K., Buđa, R., Bosilj, A., Milas, A., Pavin, N., and Tolić, I.M. (2017). Microtubule Sliding within the Bridging Fiber Pushes Kinetochore Fibers Apart to Segregate Chromosomes. Dev Cell 43, 11-23 e16.

Wandke, C., Barišić, M., Sigl, R., Rauch, V., Wolf, F., Amaro, A.C., Tan, C.H., Pereira, A.J., Kutay, U., Maiato, H., Meraldi, P., and Geley, S. (2012). Human chromokinesins promote chromosome congression and spindle microtubule dynamics during mitosis. J Cell Biol 198, 847-863.

Waters, J.C., Skibbens, R.V., and Salmon, E.D. (1996). Oscillating mitotic newt lung cell kinetochores are, on average, under tension and rarely push. Journal of Cell Science 109, 2823-2831.

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

West, R.R., Malmstrom, T., and Mcintosh, R.J. (2002). Kinesins klp5(+) and klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. J Cell Sci 115, 931-940.

West, R.R., Malmstrom, T., Troxell, C., and Mcintosh, R.J. (2001). Two related kinesins, klp5+ and klp6+, foster microtubule disassembly and are required for meiosis in fission yeast. Mol Biol Cell 12, 3919-3932.

Wise, D., Cassimeris, L., Rieder, C.L., Wadsworth, P., and Salmon, E.D. (1991). Chromosome fiber dynamics and congression oscillations in metaphase PtK2 cells at 23 degrees C. Cell Motil Cytoskeleton 18, 131-142.

Wollman, R., Civelekoglu-Scholey, G., Scholey, J.M., Mogilner, A. (2008). Reverse engineering of force integration during mitosis in the Drosophila embryo. Mol Syst Biol 4, 195

Yamashita, A., Sato, M., Fujita, A., Yamamoto, M., and Toda, T. (2005). The roles of fission yeast ase1 in mitotic cell division, meiotic nuclear oscillation, and cytokinesis checkpoint signaling. Mol Biol Cell 16, 1378-1395.

Zimmerman, S., Daga, R.R., and Chang, F. (2004). Intra-nuclear microtubules and a mitotic spindle orientation checkpoint. Nat Cell Biol 6, 1245-1246.

7 Životopis i popis radova

Agneza Bosilj rođena je 18.3.1991. u Varaždinu. Diplomirala je 2015. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s temom "Redistribucija molekularnih motora tijekom oscilacija stanične jezgre" pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Matka Glunčića. Od 2015. godine zaposlena je kao asistentica na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za teorijsku fiziku u grupi prof. dr. sc. Nenada Pavina, u sklopu čega i radi doktorat. Radila je na projektima DFG i HRZZ. Kao asistentica, držala je vježbe iz kolegija Fizika za studente Biološkog odsjeka PMF-a i vježbe i praktikum iz kolegija Računarstvo i praktikum za studente Fizičkog odsjeka PMF-a. Aktivno je sudjelovala (usmenom ili posterskom prezentacijom) na 7 međunarodnih i 2 domaća znanstvena skupa. U sklopu znanstvenog rada napisala je dva članka na kojima je dijeljeni prvi ili drugi autor, koji su objavljeni u CC znanstvenim časopisima:

K. Vukušić, R. Buđa, A. Bosilj, A. Milas, N. Pavin, and I. M. Tolić, *Microtubule sliding within the bridging fiber pushes kinetochore fibers apart to segregate chromosomes*, Dev Cell 43, 11-23 (2017).

A. H. Klemm, A. Bosilj, M. Glunčić, N. Pavin and I. M. Tolić, *Metaphase kinetochore movements are regulated by kinesin-8 motors and microtubule dynamic instability*, Mol Biol Cell 29, 1332-1345 (2018).

8 Životopis mentora

Nenad Pavin rođen je 05.05.1967. u Rijeci. Osnovnoškolsko obrazovanje započinje 1974. g. u Rijeci, a završava ga 1982. u Zadru, gdje također 1986.g. završava i srednju školu. Potom upisuje studij fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu gdje 1993.g. stječe zvanje diplomirani inženjer fizike te potom upisuje poslijediplomski studij gdje 1998.g. stječe zvanje magistar fizike. Doktorsku disertaciju izrađuje pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Vladimira Paara na istom fakultetu, naslova „Kaotični tranzijenti u novoj populacijskoj jednadžbi s rupom i njihov odraz na fraktalnu strukturu Arnoldovih jezika“, te ju brani 1999.g.

Profesionalnu karijeru započinje na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, gdje od 1993.-2001.g. radi kao znanstveni novak na problemima iz teorije kaosa te se od 2001.g. na istom odsjeku zapošljava kao docent. Na znanstveno usavršavanje na Max Planck Institutu za fiziku kompleksnih sustava u Dresdenu odlazi 2007.g. gdje 4 godine boravi kao gost-znansvenik kod prof. dr. sc. Franka Jülichera. Za vrijeme tog boravka svoj znanstveni interes proširuje na proučavanje fizikalnih procesa važnih u razumijevanju stanične biologije.

Ukupno je objavio 49 znanstvena rada od toga 44 u časopisima koji su zastupljeni u Current contents (CC). Među njima se ističu radovi objavljeni u časopisima velikom faktora utjecaja: Cell – 2 rada (IF 33.116), Nature Cell Biology (IF 20.058) – 1 rad, Nature Communications – 2 rada (IF 12.124), Annual Review of Biophysics – 1 rad (IF 10.676), Developmental Cell – 1 rad (IF 9.174), Physical Review Letters – 2 rada (IF 7.645). Pod njegovim stručnim vodstvom izrađeno je 5 doktorskih disertacija te 8 diplomskih radova. Održao je više od 20 predavanja na međunarodnim znanstvenim skupovima i znanstvenim institutima. Kao voditelj ili suradnik, sudjelovao je u izvođenju niza projekata uključujući projekte koji se trenutno izvode: ERC Synergy„Molecular origins of aneuploidies in healthy and diseased human tissues (Aneuploidy)“ (iznos: 10,000,000 EUR), projekt Hrvatske zaklade za znanost (iznos: 1,000,000 HRK), projekt Znanstveni centar izvrsnosti za kvantne i kompleksne sustave te reprezentacije Liejevih algebri (iznos: 36.956.624,09 HRK).

Dobitnik je Državne nagrade za znanost za 2015. godinu. Također, dodijeljena je Nagrada Europskog društva za mikroskopiju za izvanredan članak u kategoriji znanosti o životu: “The mitotic spindle is chiral due to torques within microtubule bundles”, M. Novak, B. Polak, J.

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

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