

Izučavanje geneze pogrešaka u diobi živih stanica

Pisačić, Veronika

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:436561>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Veronika Pisačić

Izučavanje geneze pogrešaka u diobi živih
stanica

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
FIZIKA; SMJER ISTRAŽIVAČKI

Veronika Pisačić

Diplomski rad

**Izučavanje geneze pogrešaka u diobi
živih stanica**

Voditelj diplomskog rada: prof. dr. sc., Nenad Pavin

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____

2. _____

3. _____

Datum polaganja: _____

Zagreb, 2022.

Od srca zahvaljujem mentoru Nenadu Pavinu na strpljenju i pomoći u izradi ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem svim članovima Nenad Pavin grupe, posebno Ivani Ban i Luciji Tomašić.

Sažetak

Mnoge tumorske stanice posjeduju neispravan broj kromosoma i jedno od gorućih pitanja je objasniti koji mehanizmi tijekom evolucije stanica dovode do pojave stanica s neispravnim brojem kromosoma, tzv. aneuploidnih stanica. Iako je aneuploidija iznimno štetna za većinu stanica te uzrokuje njihovu smrt, to nije slučaj kod tumorskih stanica. Stoga nam je od iznimne važnosti otkriti što omogućava aneuploidnim stanicama preživljavanje i toliko brzo reproduciranje u tumorima. Da bi to otkrili razvijen je matematički model koji opisuje evoluciju stanica s određenim brojem kromosoma, tj. s određenim kariotipom. No, kako je broj različitih kariotipa jako velik, uvodimo novi koncept, makrokariotip, te tražimo stacionarno rješenje *rate* jednadžbe. Problem se potom svodi na svojstvenu jednadžbu koju rješavamo numerički koristeći programski jezik Phyton. Detaljom analizom stanica s maksimalno dvije kopije kromosoma možemo zaključiti da iako se aneuploidne stanice 20% sporije proliferiraju, uz jednaku vjerojatnost za apoptozu kao i ostale stanice, one će u potpunosti prevladati. Također, povećanjem vjerojatnosti misegregacije jedne kopije kromosoma, prevladavaju aneuploidne stanice neovisno o tome što se proliferiraju sporije i imaju veću vjerojatnost za smrt. Osim toga, istražili smo i ponašanje sustav u kojem imamo izdvojen jedan od kromosoma, kromosom 15, te smo zaključili da će takve stanice prevladati ili zbog njihove smanjene apoptoze ili zbog smanjene apoptoze u kombinaciji s njihovom povećanom proliferacijom.

Ključne riječi: tumorske stanice, aneuploidija, matematički model, kariotip, makrokariotip, *rate* jednadžba, proliferacija stanica, apoptoza, misegregacija kromosoma.

Studying origins of missegregation in living cells

Abstract

Many tumor cells have an incorrect number of chromosomes and one of the burning issues is to explain which mechanisms during cell evolution lead to the occurrence of cells with an incorrect number of chromosomes known as aneuploid cells. Although aneuploidy is extremely harmful to most cells and causes their death, this is not the case with tumor cells. Therefore, it is extremely important for us to find out what enables aneuploid cells to survive and reproduce so quickly in tumors. To discover this, a mathematical model was developed that describes the evolution of cells with a certain number of chromosomes, i.e. with a certain karyotype. However, since the number of different karyotypes is very large, we introduce a new concept, the macrokaryotype, and look for a stationary solution of the rate equation. The problem is then reduced to an eigenvalue problem that we solve numerically using Python. By detailed analysis of cells with a maximum of two chromosome copies, we can conclude that although aneuploid cells proliferate 20% more slowly, with the same probability of apoptosis as other cells, they will completely prevail. Also, by increasing the probability of missegregation of one chromosome copy, aneuploid cells predominate regardless of the fact that they proliferate more slowly and are more likely to die. In addition, we investigated the behavior of a system in which we have isolated one of the chromosomes, chromosome 15, and we concluded that such cells will prevail either because of their reduced apoptosis or because of reduced apoptosis in combination with their increased proliferation.

Keywords: tumor cells, aneuploidy, mathematical model, karyotype, macrokaryotype, rate equation, cell proliferation, apoptosis, chromosome missegregation.

Sadržaj

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Uvod | 1 |
| 2 | Teorijska pozadina | 4 |
| 2.1 | Kariotip | 4 |
| 2.2 | Dioba stanica | 6 |
| 3 | Matematički model | 8 |
| 3.1 | Rate jednažba | 8 |
| 3.2 | Makrokariotip | 8 |
| 3.3 | Rate jednažba za sustav s maksimalno dvije kopije kromosoma | 10 |
| 3.4 | Rate jednažba za sustav s maksimalno dvije kopije kromosoma + specifični kromosom 15 | 12 |
| 4 | Rezultati | 15 |
| 4.1 | Rezultati za sustav s maksimalno dvije kopije kromosoma | 15 |
| 4.2 | Utjecaj specifičnog kromosoma na proliferaciju, apoptozu i misegregaciju | 20 |
| 5 | Zaključak | 25 |
| | Literatura | 27 |

1 Uvod

Različite vrste genskih promjena dovode do nastanka tumora. One variraju u svojoj veličini od točkastih mutacija pa sve do pojave viška ili manjka cijelog kromosoma što je poznato pod nazivom *aneuploidija*. Iako je aneuploidija iznimno štetna za zdrave stanice pa uzrokuje smanjenje njihovog fitnesa, a u konačnici i smrt (Sheltzer et al., 2017.), to nije slučaj u tumorskim stanicama. Naime, ~ 90 % svih tumorskih stanica su aneuploidne, a ovisno o vrsti tumora opaža se od 26 % do čak 99% aneuploidnih stanica (Taylor et al., 2018., Santaguida and Amon, 2015.). Štoviše, određene vrste tumora posjeduju karakteristične aneuploidne uzorke što nas navodi na zaključak da određene aneuploidije potiču nastanak tumora (Ben-David et al., 2017.).

Do aneuploidije dolazi uslijed misegregacije kromosoma koja se u literaturi često naziva kromosomska nestabilnost (*eng. chromosome instability*, CIN). Iako je CIN jako koleriran sa stupnjem aneuploidnosti, tj. aneuploidne stanice češće se misegregiraju, postoje situacije u kojima je stanica aneuploidna, a kromosomski stabilna (Sheltzer, J. M., 2013.). Najnovija istraživanja otkrivaju da aneuploidija može potaknuti, ali i potisnuti nastanak tumora. Naime, sustavnim uvođenjem dodatnih kromosoma u genome kvasca pokazalo se da dodatna kopija jednog od kromosoma dovodi do sporije proliferacije takvih stanica i ima razne štetne metaboličke i fiziološke posljedice (Torres, E. M. et al., 2007.). Sličan zaključak dobiven je proučavanjem ljudskih i mišjih staničnih linija (Williams, B. R. et al., 2008.). S druge strane, analiza uzoraka kliničkih tumora pokazala je pozitivnu korelaciju između stupnja aneuploidije i povećane proliferacije. Istraživanja na mišjim embrionalnim matičnim stanicama (mESC) i ljudskim embrionalnim matičnim stanicama (hESC) pokazala su da kromosom s tri kopije (trisomija) također može i potaknuti tumor. Na primjer, u kulturama hESC-a obično nastaje trisomija kromosoma 12 te se povezuje s povećanom proliferacijom i nastankom tumora (Ben-David, U. et al., 2014.).

Općenito, istraživanja upućuju da je aneuploidija štetna, ali pod određenim uvjetima može povećati njihovu sposobnost umnožavanja. Stadij tumora, tip stanice, genetski sklop, tumorsko mikrokruženje i imunološki sustav određuju okolnosti pod kojima aneuploidija može pokrenuti tumorogenezu (Ben-David and Amon, 2019.).

Eksperimentalno su ovakvi problemi iznimno zahtjevni jer aneuploidija zahvaća velik broj gena pa je teško pratiti koji od njih utječu na daljnju evoluciju stanica tije-

kom mnogo generacija. Zbog toga su razvijeni različiti matematički modeli. Oni nam mogu jednostavno otkriti koji mehanizmi utječu na rezultate koje vidimo u eksperimentu, ali isto tako mogu predvidjeti neke nove ishode i time obogatiti eksperimentalna istraživanja.

Jedan od njih je stohastički model koji ispituje efekte misegregacije kromosoma na dinamiku rasta populacije i raspodjelu broja kromosoma. Taj model dao nam je gornju granicu misegregacije kromosoma za koju je moguće preživljavanje diploidne populacije bez kompletnog gubitka kromosoma te, također, minimalni interval vjerojatnosti misegregacije kromosoma za koji je moguće 100% preživljavanje klonova (Gusev et al., 2000.).

Budući da nije jasno koja je točna uloga, lokacija i veza između ključnih gena koje reguliraju rast, smrt i podjelu kromosoma, razvijen je model koji je istražio kako razlike u raspodjeli gena na kromosomima utječu na razvoj aneuploidnih stanica (Araujo et al., 2013.).

I dalje ostaje pitanje kako izgleda evolucija tumorskih kariotipa, koji sve mehanizmi i u kojoj mjeri utječu na njihovu diobu te pojavu određenih aneuploidija nakon mnogo generacija. Zbog toga je razvijen matematički model koji opisuje evoluciju broja stanica određenog kariotipa (Ban et al., 2022.). Taj model iskorišten je kako bi se utvrdilo koji mehanizmi utječu na rezultate dobivene u eksperimentima na miševima (Trakala et al., 2021.). Naime, tamo se vidi da i u predtumorskim i tumorskim stanicama imamo puno veći udio kromosoma s viškom kopija nego s manjkom, dok se u tumorskim stanicama posebno uočava višak kopija kromosoma 14 i 15 u gotovo svim aneuploidnim stanicama, dok je višak kopija drugih kromosoma samo 8%. Model je pokazao da je povećana apoptoza zajedno sa sporijom proliferacijom stanica s jednom kopijom kromosoma (monosomija) zaslužna za dominaciju stanica s viškom kopija kromosoma u predtumorskim stanicama. Tumorski kariotipi s viškom kopija jednog kromosoma mogu se objasniti povećanom proliferacijom takvih stanica, dok se višak kopija dva kromosoma može objasniti povećanom proliferacijom zajedno sa smanjenom apoptozom (Ban et al., 2022.).

U ovom diplomskom radu koristit će se matematički model baziran na makrokariotipu. Najprije ćemo naglasiti njegove glavne koncepte, a potom ćemo proučavati ponašanja sustava u stacionarnom stanju, za što će biti prikladan *eigenvalue* pristup. Detaljno ćemo istražiti parametarski prostor modela, tj. pogledati pod kojim

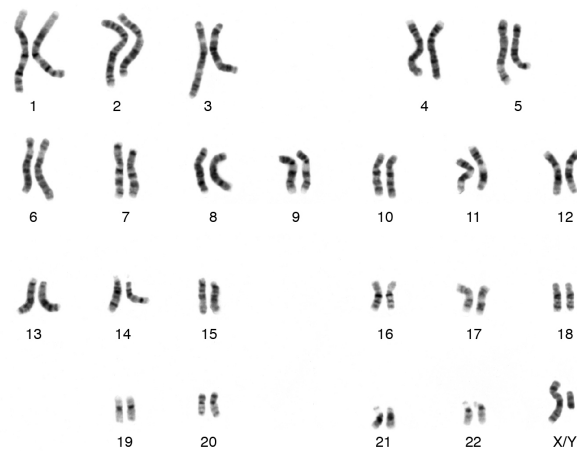
uvjetima dobivamo stanice s neispravnim brojem kromosoma, tzv. aneuploidne stanice. Poučeni prethodnim istraživanjima, pratit ćemo kako proliferacija stanica, vjerojatnost za misegregaciju kromosoma te apoptoza utječu na stvaranje scenarija koje uočavamo u tumorima.

2 Teorijska pozadina

Kako bismo mogli razumjeti pojavu nepravilnog broja kromosoma do koje dolazi prilikom višestrukih staničnih dioba potrebno je uvesti matematički model koji će opisati evoluciju kariotipa od zdrave diploidne stanice do aneuploidnih stanica. Model uključuje opis različitih kariotipa, ali i procese koji dovode do promjene broja kromosoma. Da bi se uključili svi važni biološki procesi model još opisuje i ovisnost brzine diobe o kariotipu te programiranu smrt koja se naziva apoptoza.

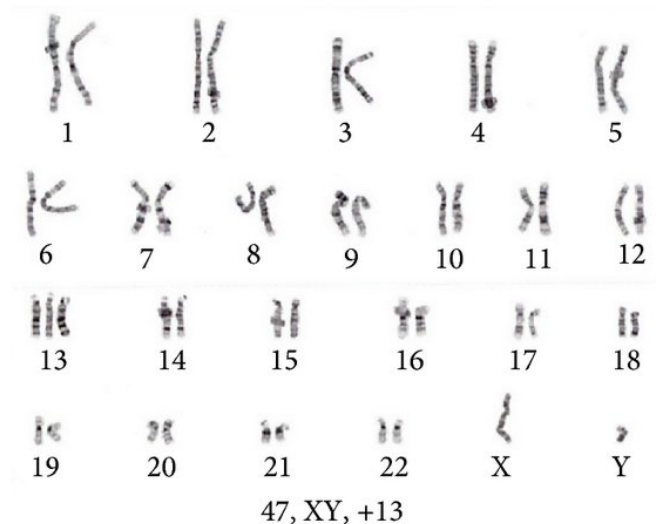
2.1 Kariotip

Svaka stanica ima određeni *kariotip*. Kariotip nam govori koliko stanica ima kromosoma, kako ti kromosomi izgledaju te koliko svaki od njih ima kopija. Primjer kariotipa zdravih tjelesnih stanica čovjeka prikazan je na Slici 2.1. Čovjek ima 22 kromosoma koji se pojavljuju s dvije kopije te spolne kromosome X i Y.



Slika 2.1: Kariotip čovjeka (preuzeto iz [10]). Kromosomi su označeni brojevima od 1 do 22 te na kraju posebno označen spolni kromosom (X/Y). Svaki kromosom ima dvije kopije.

Stanice kod kojih svi kromosomi imaju jednak broj kopija nazivaju se *euploidi*. Naše zdrave tjelesne stanice imaju po *dvije* kopije svakog kromosoma pa su one *diploidi* (Slika 2.1), dok, na primjer, spolne stanice imaju *jednu* kopiju svakog kromosoma pa su one *haploidi*. Sve stanice koje nisu euploidi, nazivaju se *aneuploidi*. Kod njih jedan ili više kromosoma imaju višak ili manjak kopija u odnosu na ostale (Slika 2.2).

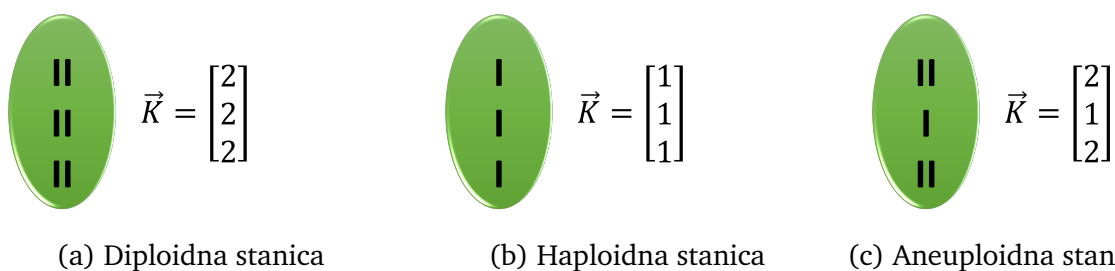


Slika 2.2: Aneuploidni kariotip čovjeka (preuzeto iz [11]). Kromosomi su označeni brojevima od 1 do 22 te na kraju posebno označeni spolni kromosomi X i Y. Svi kromosomi ima dvije kopije osim kromosoma 13 koji ima 3 kopije.

Kariotip stanice s 23 kromosoma matematički opisujemo s vektorom \vec{K} :

$$\vec{K} = (c_1, c_2, \dots, c_{23}) \quad (2.1)$$

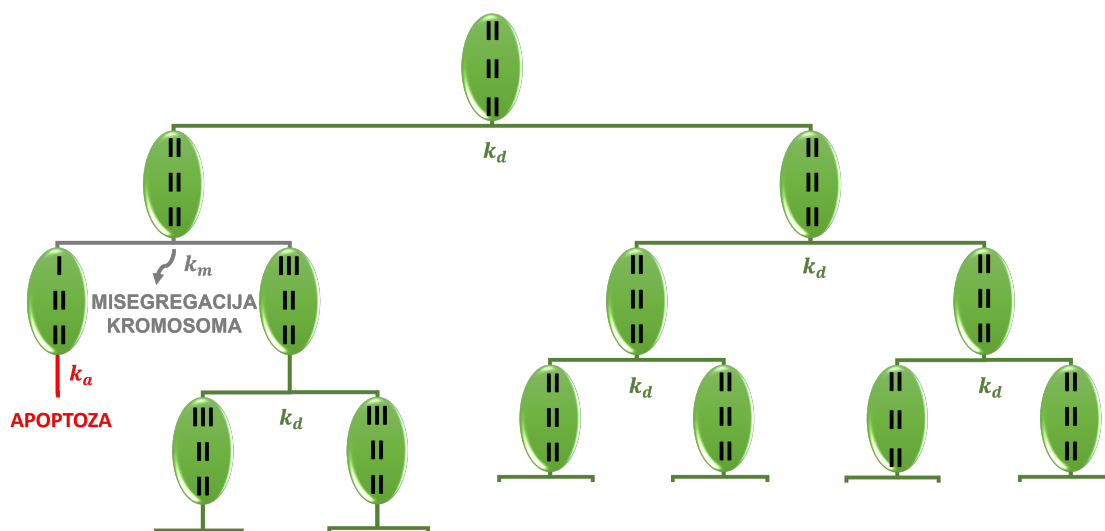
Vektor \vec{K} sastoji od 23 komponente gdje njegova i -ta komponenta, c_i , poprima isključivo prirodne vrijednosti, a označava broj kopija i -tog kromosoma. Pojednostavljeni primjeri stanica sa samo tri kromosoma i njihovi kariotipi prikazani su na Slici 2.3.



Slika 2.3: Primjeri stanica i njihovih kariotipa. Stanice su prikazane u obliku zelenih ovala dok su kromosomi označeni crnim štapićima. Radi jednostavnosti sheme stanice imaju samo 3 kromosoma, a razlikuju se po broju kopija. (a) Diploidna stanica. Sva tri kromosoma imaju dvije kopije ($c_1 = c_2 = c_3 = 2$). (b) Haploidna stanica. Sva tri kromosoma imaju jednu kopiju ($c_1 = c_2 = c_3 = 1$). (c) Aneuploidna stanica. Prvi i treći kromosom imaju dvije kopije ($c_1 = c_3 = 2$), dok drugi kromosom ima jednu kopiju ($c_2 = 1$).

2.2 Dioba stanica

Prilikom diobe, stanice se mogu podijeliti ispravno, ali može doći i do pogrešaka. Pogreške koje se događaju pri diobi stanica najveći su uzrok težih bolesti kao što su tumori i Downov sindrom. Nama je glavni cilj opisati što se događa prilikom višestrukih staničnih dioba te prema kojem će kariotipu naposljetku težiti takvi procesi. Stoga pogledajmo shematski prikaz diobe prikazan na Slici 2.4. Radi jednostavnosti sheme,



Slika 2.4: Shematski prikaz diobe stanica. Stanice su prikazane u obliku zelenih ovala dok su kromosomi označeni crnim štapićima. Radi jednostavnosti sheme stanice imaju samo 3 kromosoma. Stanica od koje kreće dioba je diploidna te se podijeli na dvije identične stanice kćeri brzinom k_d . U desnoj grani dioba se nastavlja ispravno i nastaju stanice identične prvoj stanici. U lijevoj grani dolazi do misegregacije kromosoma brzinom k_m . Prva stanica kćeri ima jednu kopiju (monosomija) prvog kromosoma, dok druga stanica kćeri ima tri kopije (trisomija) prvog kromosoma. Stanica s monosomijom naposljetku umire brzinom k_a (apoptoza), a stanica s trisomijom se dalje dijeli.

stanice imaju samo 3 kromosoma, dok će ostatak diplomskog rada sadržavati informaciju o 23 kromosoma koliko ih ima čovjek. Na shemi se može vidjeti ispravna dioba u čijem su slučaju obje stanice kćeri dobile polovinu genskog materijala nastalog nakon duplikacije pa izgledaju identično kao stanica majka. Međutim, ako se prilikom diobe kromosomi ne povežu pravilno na diobeno vreteno, dolazi do misegregacije (Bakhoun et al., 2009; Cimini, 2008; Dewhurst et al., 2014; Nicholson et al., 2015a; Thompson and Compton, 2011b). Tada stanice kćeri imaju jednu kopiju nekog kromosoma više ili manje u odnosu na roditeljsku stanicu. Općenito se misegregacija može dogoditi na bilo kojem od kromosoma, dok je na shemi prikazana samo misegregacija prvog kromosoma. Osim ispravne diobe i misegregacije, može

se dogoditi da stanica nema dovoljno dobre uvjete za život te umire. Taj se događaj naziva apoptoza i također je prikazan na Slici 2.4.

Svaka stanica ima dobro definirano vrijeme života, $T(\vec{K})$, na kraju kojeg će doživjeti jedan od ova tri moguća ishoda, stoga mora vrijediti:

$$p_d(\vec{K}) + p_m(\vec{K}) + p_a(\vec{K}) = 1 \quad (2.2)$$

gdje su p_d , p_m i p_a vjerojatnosti za ispravnu diobu, misegregaciju i apoptozu stanice kariotipa \vec{K} . Misegregacija kromosoma u stanici je nezavisan proces. To znači da misegregacija jednog kromosoma ne utječe na misegregaciju nekog drugog kromosoma, stoga mora vrijediti da je $p_m(\vec{K}) = \sum_{i=1}^{23} p_{m_i}(\vec{K})$. Misegregacija i -tog kromosoma, $p_{m_i}(\vec{K})$, ovisit će o broju kopija tog kromosoma, c_i , pa vrijedi $p_{m_i}(\vec{K}) = p_0(\vec{K})c_i$ gdje je p_0 vjerojatnost misegregacije jedne kopije. Vjerojatnosti za misegregaciju i apoptozu povezane su s pripadnim brzinama za misegregaciju, $k_m(\vec{K})$, i apoptozu, $k_a(\vec{K})$, na sljedeći način: $k_{m,a}(\vec{K}) = \beta(\vec{K})p_{m,a}(\vec{K})/\ln 4$. $\beta(\vec{K})$ je važna veličina koju zovemo proliferacija stanica, a govori nam koliko brzo se stanica određenog kariotipa dijeli. Ona je povezana s vremenom života na sljedeći način: $\beta(\vec{K}) = \ln 2/T(\vec{K})$. Tada se brzina ispravne diobe, $k_d(\vec{K})$, implicitno dobiva preko izraza, $\beta(\vec{K}) = k_d(\vec{K}) + k_m(\vec{K}) + k_a(\vec{K})$.

3 Matematički model

3.1 Rate jednadžba

Kako bismo razumjeli evoluciju tumorskih kariotipa, potrebno je izračunati kako se broj stanica određenog kariotipa, $N(\vec{K})$, mijenja u vremenu. Za to nam koristi sljedeća *rate* jednadžba (Ban et al., 2022.):

$$\begin{aligned} \frac{dN(\vec{K})}{dt} = & [k_d(\vec{K}) - k_m(\vec{K}) - k_a(\vec{K})]N(\vec{K}) + \sum_{i=1}^{n=23} k_m(\vec{K} + \vec{e}_i)N(\vec{K} + \vec{e}_i) + \\ & + \sum_{i=1}^{n=23} k_m(\vec{K} - \vec{e}_i)N(\vec{K} - \vec{e}_i) \end{aligned} \quad (3.1)$$

Ova jednadžba nam govori sljedeće: ako se stanica ispravno podijeli doći će do povećanja broja stanica $N(\vec{K})$, član:

$$+k_d(\vec{K})N(\vec{K})$$

Ako pak dođe do pogreške pri diobi stanice nastat će stanice drugačijeg kariotipa što će smanjiti broj $N(\vec{K})$, član:

$$-k_m(\vec{K})N(\vec{K})$$

Ako stanica umre, naravno, dolazi do smanjenja broja stanica kariotipa \vec{K} , član:

$$-k_a(\vec{K})N(\vec{K})$$

Četvrti član opisuje situaciju u kojoj roditeljska stanica ima kopiju i -tog kromosoma više te ju prilikom neispravne diobe izgubi pa nastane stanica kariotipa \vec{K} , dok posljednji član opisuje situaciju u kojoj roditeljska stanica ima kopiju i -tog kromosoma manje te ju prilikom neispravne diobe dobije pa nastane stanica kariotipa \vec{K} .

3.2 Makrokariotip

Teorijski opis evolucije tumorskih kariotipa iznimno je zahtjevan zbog vrlo velikog broja tumorskih stanica koje imaju vrlo raznolike kariotipe. Što je veći maksimalni broj kopija koje kromosomi mogu imati, veći je broj mogućih kariotipa, a time i kompleksnost problema s kojim se bavimo. Zbog toga ćemo grupirati sve kromosome koji

imaju jednak broj kopija te uvesti novu veličinu koju zovemo *makrokariotip*. Tako smo izgubili informaciju o svakom pojedinom kromosomu, ali smo zato znatno smanjili dimenziju problema jer umjesto da se bavimo s L^{23} različita kariotipa, bavimo se s $22^{L-1}L$ različita makrokariotipa gdje je L maksimalan broj kopija pojedinog kromosoma. Na primjer, za stanicu kojoj kromosomi mogu imati 6 kopija ($L = 6$), broj kariotipa je $6^{23} \approx 7.9 \cdot 10^{17}$, dok je broj različitih makrokariotipa $6 \cdot 22^5 \approx 3.1 \cdot 10^7$ što je čak 10 redova veličina manje. Matematički, makrokariotip definiramo kao L-komponentni vektor:

$$\vec{M} = (x_1, x_2, \dots, x_L) \quad (3.2)$$

Njegove komponente, $x_l = \sum_{i=1}^{23} \delta_{l,c_i}$, predstavljaju broj kromosoma koji imaju l kopija. Zbog zakona sačuvanja broja kromosoma mora vrijediti da je $x_1 + x_2 + \dots + x_L = 23$.

Broj stanica određenog makrokariotipa, $N(\vec{M})$, dan je sljedećim izrazom (Ban et al., 2022.):

$$N(\vec{M}) \equiv \frac{1}{x_1!x_2! \dots x_L!} \sum_{all \ perm.} N(\vec{K}) \quad (3.3)$$

gdje suma ide po svim permutacijama kromosoma, dok se faktor ispred sume brine da se permutacije kromosoma s istim brojem kopija ne broje više puta. Kako bi dobili *rate* jednadžbu za makrokariotip, izraz (3.1) moramo posumirati po svim permutacijama kariotipa te nakon malo sređivanja dobivamo:

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{N}(\vec{M})}{dt} = & \frac{\beta(\vec{M})}{\ln 4} [l n 4 - 2p_0(\vec{M}) \sum_{l=1}^L l x_l - 2p_a(\vec{M})] \tilde{N}(\vec{M}) + \\ & + \frac{1}{\ln 4} \sum_{l=2}^L l(x_l + 1) p_0(\vec{M} - e_{l-1} + \vec{e}_l) \beta(\vec{M} - e_{l-1} + \vec{e}_l) \tilde{N}(\vec{M} - e_{l-1} + \vec{e}_l) + \\ & + \frac{1}{\ln 4} \sum_{l=1}^{L-1} l(x_l + 1) p_0(\vec{M} + \vec{e}_l - e_{l-1}) \beta(\vec{M} + \vec{e}_l - e_{l-1}) \tilde{N}(\vec{M} + \vec{e}_l - e_{l-1}) \end{aligned} \quad (3.4)$$

Da bismo dobili gornji izraz pretpostavili smo da su brzine k_d, k_m, k_a iste za sve permutacije komponenti vektora \vec{K} , tj. da vrijedi $k_{d,m,a}(\vec{K}) = \tilde{k}_{d,m,a}(\vec{M})$. Također, iskoristili smo izraz $k_{m_i}(\vec{K} \pm \vec{e}_i) = (c_i \pm 1) p_0(\vec{K} \pm \vec{e}_i) \beta(\vec{K} \pm \vec{e}_i) / \ln 4$ te jednakost $\sum_{i=1}^{n=23} c_i = \sum_{l=1}^L l x_l$.

3.3 Rate jednažba za sustav s maksimalno dvije kopije kromosoma

Ovaj diplomski rad u svojoj glavnini istraživat će ponašanje modela za slučaj sa samo dvije kopije, $L=2$. Makrokariotip nam je tada $\vec{M} = (x_1, x_2)$, a budući da mora vrijediti $x_1 + x_2 = 23$, u ovom pojednostavljenom slučaju s maksimalno dvije kopije kromosoma, makrokariotip je u potpunosti određen jednim od ova dva broja, uzmimo da je to x_2 . Iako je ovo najjednostavniji slučaj, broj različitih kariotipa je velik, 2^{23} , dok je broj različitih makrokariotipa samo 24 pa se već sada vidi korist uvođenja tog novog koncepta. Jednadžba (3.4) postaje:

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{N}(x_2)}{dt} = & \frac{\beta(x_2)}{\ln 4} [\ln 4 - 2p_0(x_2)(23 + x_2) - 2p_a(x_2)]\tilde{N}(x_2) + \\ & + 2\frac{1}{\ln 4}(x_2 + 1)p_0(x_2 + 1)\beta(x_2 + 1)\tilde{N}(x_2 + 1) + \\ & + \frac{1}{\ln 4}(24 - x_2)p_0(x_2 - 1)\beta(x_2 - 1)\tilde{N}(x_2 - 1) \end{aligned} \quad (3.5)$$

Međutim, tkiva i organi odraslog ogranizma održavaju konstantan broj stanica. Naime, nakon formacije tkiva većina stanica odraslog organizma ulazi u fazu mirovanja (G_0 faza staničnog ciklusa) te staje s diobom sve dok nema potrebe za zamjenom oštećene ili umrle stanice. Motivirani tom činjenicom, ne želimo da nam dioba ide u beskonačnost pa u jednadžbu (3.5) uvodimo parametar saturacije, α , koji definiramo na sljedeći način:

$$\alpha \equiv \left(1 - \frac{\sum_{\vec{M}} N(\vec{M})}{N_{tot}}\right) \quad (3.6)$$

gdje je N_{tot} broj stanica nakon kojeg dioba prestaje.

Sada je naša jednadžba od interesa sljedeća:

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{N}(x_2)}{dt} = & \alpha \frac{\beta(x_2)}{\ln 4} [\ln 4 - 2p_0(x_2)(23 + x_2)]\tilde{N}(x_2) - 2\frac{\beta(x_2)}{\ln 4} p_a(x_2)\tilde{N}(x_2) + \\ & + 2\alpha \frac{1}{\ln 4}(x_2 + 1)p_0(x_2 + 1)\beta(x_2 + 1)\tilde{N}(x_2 + 1) + \\ & + \alpha \frac{1}{\ln 4}(24 - x_2)p_0(x_2 - 1)\beta(x_2 - 1)\tilde{N}(x_2 - 1) \end{aligned} \quad (3.7)$$

Kao što se može primijetiti, parametar α pojavljuje se u svim članovima osim onoga koji opisuje apoptozu. To je zato što apoptoza ni na koji način nije uvjetovana saturacijom dok svi preostali članovi utječu na povećanje broja stanica pa ih saturacija mora "gušiti".

Time smo dobili nelinearan sustav običnih diferencijalnih jednadžbi koji se može

riješiti ili numeričkom integracijom ili traženjem stacionarnog rješenja, a budući da nas zanima odrasli organizam čiji se broj stanica ne mijenja značajno u vremenu, stacionarno rješenje se nameće kao jednostavni pristup koji nam može dati korisne informacije. Dakle, tražimo stacionarno rješenje jednadžbe (3.7):

$$\frac{d\tilde{N}(x_2)}{dt} = 0 \quad (3.8)$$

te nakon množenja jednadžbe s $\frac{\ln 4}{2\alpha p_0(x_2)\beta(x_2)}$ imamo:

$$\begin{aligned} & \frac{1}{2p_a(x_2)} [\ln 4 - 2p_0(x_2)(23 + x_2)] \tilde{N}(x_2) + \\ & + 2(x_2 + 1) \frac{p_0(x_2 + 1)}{2p_a(x_2)} \frac{\beta(x_2 + 1)}{\beta(x_2)} \tilde{N}(x_2 + 1) + \\ & (24 - x_2) \frac{p_0(x_2 - 1)}{2p_a(x_2)} \frac{\beta(x_2 - 1)}{\beta(x_2)} \tilde{N}(x_2 - 1) = \\ & = \frac{1}{\alpha} \tilde{N}(x_2) \end{aligned} \quad (3.9)$$

Ako gornju jednadžbu zapišemo za svaki od 24 makrokariotipa dobit ćemo svojstvenu jednadžbu, $A\vec{N}_0 = \lambda\vec{N}_0$, gdje je A trodijagonalna 24x24 matrica oblika:

$$A = \begin{bmatrix} \frac{1}{2p_a(0)}(\ln 4 - 46p_0(0)) & \frac{p_0(1)\beta(1)}{p_a(0)\beta(0)} & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 23 \frac{p_0(0)\beta(0)}{2p_a(1)\beta(1)} & \frac{1}{2p_a(1)}(\ln 4 - 48p_0(1)) & 2 \frac{p_0(2)\beta(2)}{p_a(1)\beta(1)} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 22 \frac{p_0(1)\beta(1)}{2p_a(2)\beta(2)} & \frac{1}{2p_a(2)}(\ln 4 - 50p_0(2)) & \ddots & 0 & \vdots \\ \vdots & 0 & \ddots & \ddots & \ddots & 0 \\ 0 & \dots & 0 & \ddots & \ddots & 23 \frac{p_0(23)\beta(23)}{p_a(22)\beta(22)} \\ 0 & 0 & \dots & 0 & \frac{p_0(22)\beta(22)}{2p_a(23)\beta(23)} & \frac{1}{2p_a(23)}(\ln 4 - 92p_0(23)) \end{bmatrix} \quad (3.10)$$

U svojstvenoj jednadžbi, $\frac{1}{\alpha}$ prepoznavamo kao svojstvene vrijednosti λ , dok su \vec{N}_0 pripadni svojstveni vektori oblika:

$$\vec{N}_0 = \begin{bmatrix} N(x_2 = 0) \\ N(x_2 = 1) \\ \vdots \\ N(x_2 = 22) \\ N(x_2 = 23) \end{bmatrix} \quad (3.11)$$

Dakle, sada nam je cilj riješiti gornju matričnu jednadžbu, tj. pronaći svojstvenu

vrijednost koja odgovara stacionarnom rješenju te njoj pripadajući svojstveni vektor. Međutim, treba imati na umu da nam vektor broja stanica, \vec{N} , mora zadovoljavati dodatni uvjet, a to je definicijski izraz za saturaciju dan s (3.6). Zbog toga uvodimo konstantu, c , takvu da vrijedi $\vec{N} = c\vec{N}_0$, a koja mora biti jednaka:

$$c = \frac{N_{tot}(1 - \alpha)}{\sum_{i=0}^{23} N_{0i}} \quad (3.12)$$

kako bi traženi izraz (3.6) bio zadovoljen.

3.4 Rate jednadžba za sustav s maksimalno dvije kopije kromosoma + specifični kromosom 15

Zanimljivo je da se pri proučavanju tumorskih stanica aneuploidije uočavaju na točno određenim kromosomima. Dakle, nije svejedno je li jednu kopiju imamo na, recimo, petom kromosomu ili jednu kopiju imamo na, recimo, dvanaestom kromosomu. No, mi smo uvođenjem makrokariotipa izgubili informaciju o svakom pojedinom kromosomu. Međutim, model možemo proširiti na sljedeći način: iz makrokariotipa izdvojimo jedan od kromosoma koji se često ističe u tumorskim stanicama, npr. kromosom 15. Dakle, sada nam je makrokariotip vektor oblika: $\vec{M} = (x_1, x_2, c_{15})$, a kako mora vrijediti da je $x_1 + x_2 + 1 = 23$, makrokariotip nam je u potpunosti određen samo s dva broja: brojem kromosoma s dvije kopije, x_2 , i brojem kopija kromosoma 15, c_{15} . U ovom slučaju, rate jednadžba ima sljedeći oblik:

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{N}(x_2, c_{15})}{dt} = & \frac{\beta(x_2, c_{15})}{\ln 4} [\ln 4 - 2p_0(x_2, c_{15})(22 + x_2) - 2p_a(x_2, c_{15})] \tilde{N}(x_2, c_{15}) + \\ & + 2 \frac{1}{\ln 4} (x_2 + 1) p_0(x_2 + 1, c_{15}) \beta(x_2 + 1, c_{15}) \tilde{N}(x_2 + 1, c_{15}) + \\ & + \frac{1}{\ln 4} (23 - x_2) p_0(x_2 - 1, c_{15}) \beta(x_2 - 1, c_{15}) \tilde{N}(x_2 - 1, c_{15}) + \\ & + \frac{1}{\ln 4} (c_{15} - 1) p_0(x_2, c_{15} - 1) \beta(x_2, c_{15} - 1) \tilde{N}(x_2, c_{15} - 1) + \\ & + \frac{1}{\ln 4} (c_{15} + 1) p_0(x_2, c_{15} + 1) \beta(x_2, c_{15} + 1) \tilde{N}(x_2, c_{15} + 1) \end{aligned} \quad (3.13)$$

Ona se razlikuje od rate jednadžbe (3.5) samo po posljednja dva člana koja opisuju situaciju u kojoj roditeljska stanica ima jednu kopiju kromosoma 15 više, odnosno

manje, u odnosu na stanicu kćeri.

Sada, kao i u prethodnom poglavlju, uvodimo koeficijent saturacije, $\alpha \equiv (1 - \frac{\sum_{\vec{M}} N(\vec{M})}{N_{tot}})$, koji se pojavljuje u svim članovima na desnoj strani jednadžbe (3.13) osim u onom koji opisuje apoptozu te tražimo stacionarno rješenje:

$$\frac{d\tilde{N}(x_2, c_{15})}{dt} = 0 \quad (3.14)$$

Tako dobivamo jednadžbu oblika:

$$\begin{aligned} & \frac{1}{2p_a(x_2, c_{15})} [\ln 4 - 2p_0(x_2, c_{15})(22 + x_2)] \tilde{N}(x_2, c_{15}) + \\ & + 2(x_2 + 1) \frac{p_0(x_2 + 1, c_{15})}{2p_a(x_2, c_{15})} \frac{\beta(x_2 + 1, c_{15})}{\beta(x_2, c_{15})} \tilde{N}(x_2 + 1, c_{15}) + \\ & (23 - x_2) \frac{p_0(x_2 - 1, c_{15})}{2p_a(x_2, c_{15})} \frac{\beta(x_2 - 1, c_{15})}{\beta(x_2, c_{15})} \tilde{N}(x_2 - 1, c_{15}) + \\ & (c_{15} - 1) \frac{p_0(x_2, c_{15} - 1)}{2p_a(x_2, c_{15})} \frac{\beta(x_2, c_{15} - 1)}{\beta(x_2, c_{15})} \tilde{N}(x_2, c_{15} - 1) + \\ & (c_{15} + 1) \frac{p_0(x_2, c_{15} + 1)}{2p_a(x_2, c_{15})} \frac{\beta(x_2, c_{15} + 1)}{\beta(x_2, c_{15})} \tilde{N}(x_2, c_{15} + 1) = \\ & = \frac{1}{\alpha} \tilde{N}(x_2, c_{15}) \end{aligned} \quad (3.15)$$

Ako gornju jednadžbu napišemo u matricnom obliku za sve moguće makrokariotipe kojih je u ovom slučaju $23 \cdot 2 = 46$, dobivamo svojstvenu jednadžbu oblika $A\vec{N}_0 = \lambda\vec{N}_0$ gdje je sada A matrica dimenzija 46×46 , a svojstveni vektori, \vec{N}_0 , su oblika:

$$\vec{N}_0 = \begin{bmatrix} N(x_2 = 0, c_{15} = 1) \\ N(x_2 = 1, c_{15} = 1) \\ \vdots \\ N(x_2 = 22, c_{15} = 1) \\ N(x_2 = 0, c_{15} = 2) \\ N(x_2 = 1, c_{15} = 2) \\ \vdots \\ N(x_2 = 22, c_{15} = 2) \end{bmatrix} \quad (3.16)$$

Opet nam je cilj riješiti matricnu jednadžbu, $A\vec{N}_0 = \lambda\vec{N}_0$, tj. pronaći svojstvenu vrijednost λ koja odgovara stacionarnom rješenju te pripadni svojstveni vektor. Kao i u prethodnom slučaju, vektor broja stanica nam mora zadovoljavati definicijski izraz

za saturaciju α , pa uvodimo konstantu, c , takvu da vrijedi $\vec{N} = c\vec{N}_0$, a koja mora biti jednaka:

$$c = \frac{N_{tot}(1 - \alpha)}{\sum_{i=0}^{45} N_{0i}} \quad (3.17)$$

kako bi traženi izraz bio zadovoljen.

4 Rezultati

Prije nego počnemo tražiti svojstvene vrijednosti i vektore, potrebno je parametrizirati funkcije koje se nalaze u našoj jednadžbi: vjerojatnost misegregacije jedne kopije, $p_0(\vec{M})$, proliferaciju, $\beta(\vec{M})$, te vjerojatnost za apoptozu, $p_a(\vec{M})$. Iako je ovo model sa samo dvije kopije kromosoma, broj parametara je izuzetno velik. Naime, općenito bi imali $24 \times 24 = 576$ neovisna parametara koja nam direktno definira matrica A. No, kako u toj matrici ima puno nula, što je posljedica našeg modela koji dozvoljava da za vrijeme jedne diobe stanica može izgubiti samo jedan kromosom, istraživanje parametarskog prostora se znatno pojednostavi. Također, potrebno je definirati broj stanica nakon kojeg dioba prestaje pa uzimamo $N_{tot} = 10000$. Naposljetku, svojstveni problem rješavan je numerički koristeći NumPy i SciPy biblioteke u Pythonu.

4.1 Rezultati za sustav s maksimalno dvije kopije kromosoma

Da bismo razumjeli osnovna svojstva modela, najprije ćemo proučiti rezultate za slučaj s maksimalno dvije kopije pojedinog kromosoma. Općenito se opaža da se aneuploidne stanice nešto duže proliferiraju (Hintzen et al., 2021.; Williams et al., 2008.) pa, za početak, pretpostavljamo da ovisnost misegregacije, proliferacije i apoptoze ima sljedeću ovisnost o makrokariotipu stanice:

$$p_0(x_2) = 0.0017 \quad (4.1)$$

$$\beta(x_2) = \begin{cases} \ln 2 & \text{za } x_2 = 0 \text{ i } x_2 = 23 \\ 0.8 \ln 2 & \text{inače} \end{cases} \quad (4.2)$$

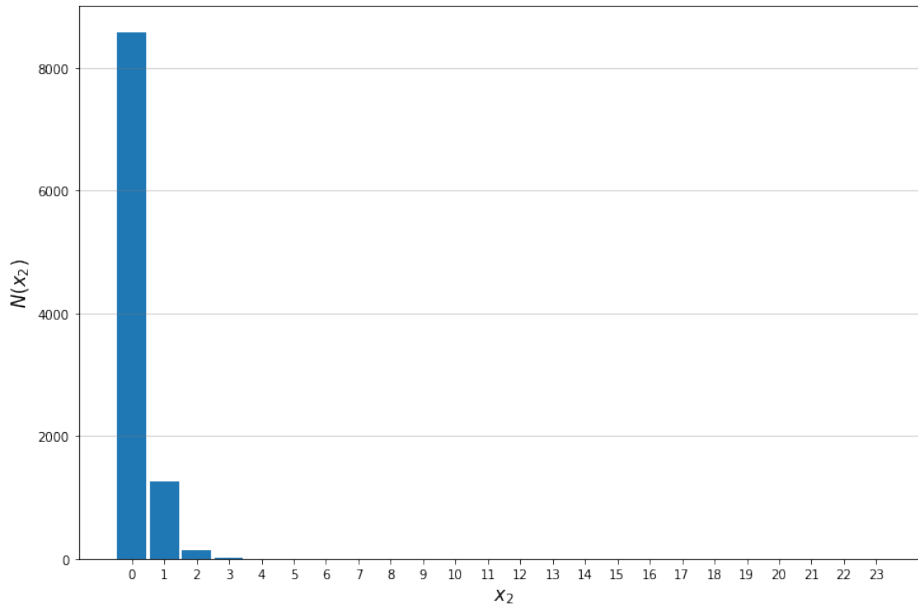
$$p_a(x_2) = \begin{cases} 10^{-5} & \text{za } x_2 = 0 \text{ i } x_2 = 23 \\ 1.25 \cdot 10^{-5} & \text{inače} \end{cases} \quad (4.3)$$

Vjerojatnost misegregacije jedne kopije, izraz (4.1), preuzeta je iz [12], dok vjerojatnost apoptoze, izraz (4.3), istražujemo ovdje. Svi korišteni parametri dodatno su prikazani u Tablici 4.1. Nakon što smo njih odredili, rješavamo jednadžbu (3.8).

Na Slici 4.1 možemo vidjeti što se događa kada se stanice koju se aneuploidne dijele sporije od euploidnih, a imaju i veću vjerojatnost za umiranje. Prevladavaju haploidne stanice uz nezanemariv broj aneuploidnih stanica makrokariotipa $x_2 = 1$ i

| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|--|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | 0.0017 (preuzeto iz [12]) |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $0.8 \ln 2$ za aneuploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} za euploide |
| | $1.25 \cdot 10^{-5}$ za aneuploide |

Tablica 4.1: Parametri korišteni u modelu.

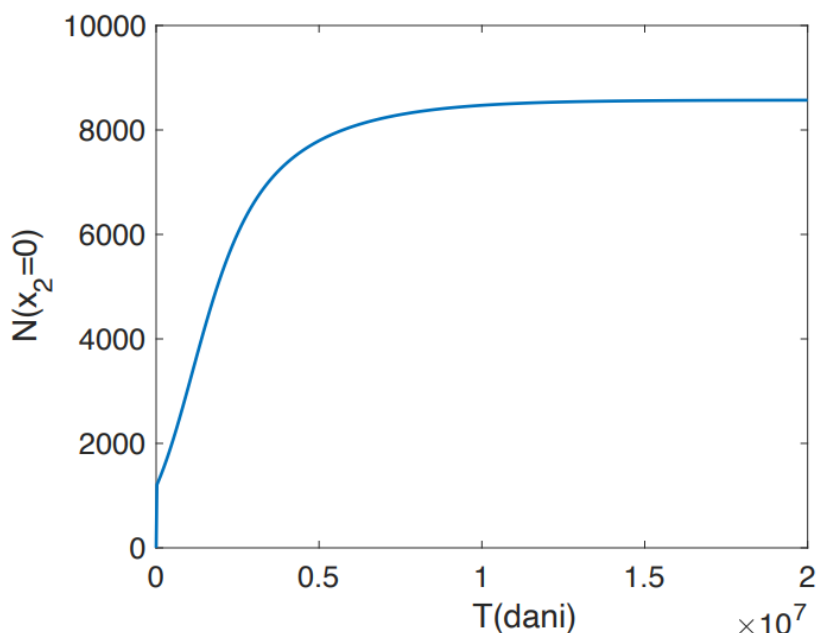


Slika 4.1: Raspodjela broja stanica u ovisnost o makrokariotipu. Prevladavaju haploidne stanice ($x_2 = 0$) te aneuploidne stanice makrokariotipa $x_2 = 1$ te $x_2 = 2$. Korišteni parametri su dani u Tablici 4.1.

$x_2 = 2$.

Premda nam informacija o stacionarnom stanju pruža uvid u moguće ishode evolucije kariotipa, također je bitno razumjeti koliko vremena treba sustavu da dođe u to stanje. Direktnom numeričkom integracijom jednadžbe (3.7) za parametre kao u Tablici 4.1 dobivamo rezultat prikazan na Slici 4.2. Prateći broj haploidnih stanica ($x_2 = 0$) u vremenu može se primijetiti da sustav ulazi u stacionarno stanje nakon otprilike $2 \cdot 10^7$ dana. Ovako spor ulazak u stacionarno stanje sugerira nam da su oba pristupa bitna, i proučavanje dinamike sustava i stacionarno stanje.

Ono što sada želimo istražiti je koji procesi te koliko jako utječu na pojavu aneuploidnih stanica. Za početak, pogledajmo kako nam smanjenje proliferacije utječe na ponašanje sustava. U slučaju kada je proliferacija aneuploidnih stanica 10 puta manja u odnosu na parametre korištene na Slici 4.1 dolazi do vidljivih promjena u



Slika 4.2: Promjena broja haploidnih stanica u vremenu dobivena direktnom numeričkom integracijom za parametre kao u Tablici 4.1. Sustav ulazi u stacionarno stanje nakon otprilike $2 \cdot 10^7$ dana.

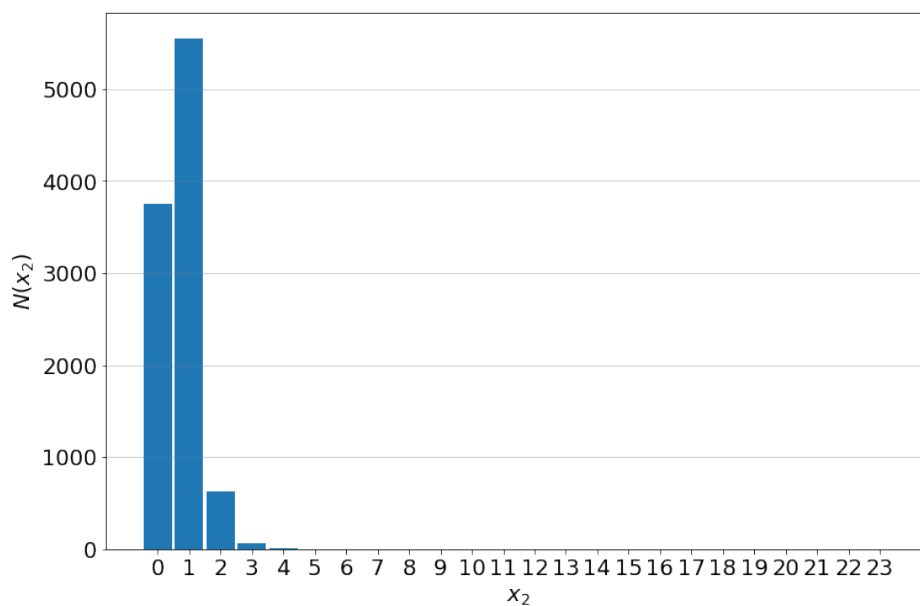
raspodjeli broja stanica (Slika 4.3). Naizgled je ovaj rezultat kontraintuitivan jer

| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|--|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | 0.0017 (preuzeto iz [12]) |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $0.08 \ln 2$ za aneuploide |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} za euploide |
| | $1.25 \cdot 10^{-5}$ za aneuploide |

Tablica 4.2: Parametri korišteni u modelu.

ispada da još sporije dijeljenje aneuploidnih stanica rezultira u njihovoj većoj zastupljenosti. Međutim, to se može objasniti činjenicom da smanjenje proliferacije dovodi i do smanjenja brzine umiranja. Osim toga, važno je vidjeti da je broj haploidnih stanica sada manji od aneuploidnih, ali i dalje imamo njihov značajan broj.

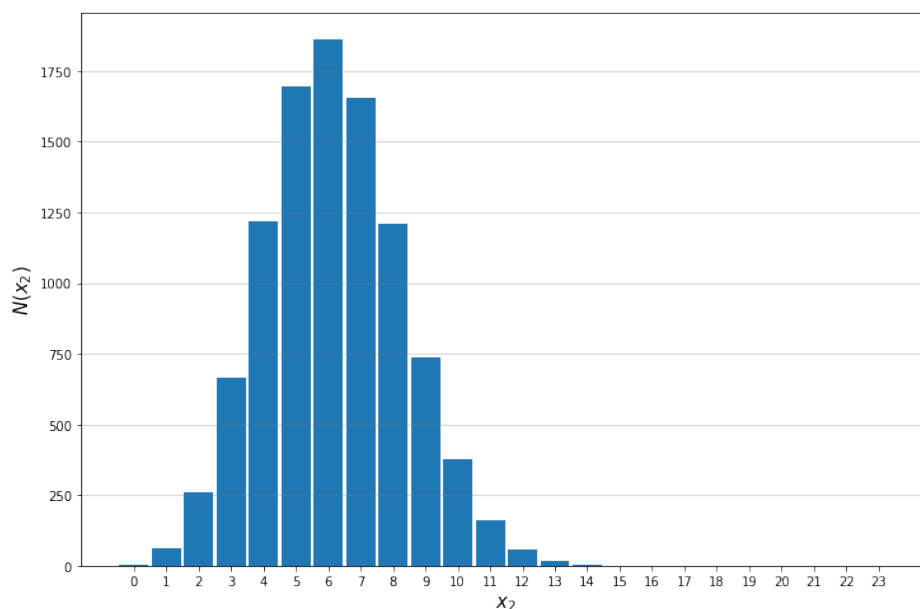
Premda se na Slici 4.3 vidi značajan broj aneuploidnih stanica, nas je zanimalo pod kojim uvjetima se mogu pojaviti stanice koje su gotovo sve aneuploidne. U tu smo svrhu istraživali kako vjerojatnost apoptoze utječe na rezultate. Neka sve stanice imaju jednaku vjerojatnost za apoptozu dok se aneuploidne stanice proliferiraju 20% sporije u odnosu na euploidne kao što je prikazano u Tablici 4.3. Rezultat koji dobivamo prikazan je na Slici 4.4. Iako se euploidne stanice proliferiraju brže, zbog toga



Slika 4.3: Raspodjela broja stanica za parametre kao u Tablici 4.2.

| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|--|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | 0.0017 (preuzeto iz [12]) |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $0.8 \ln 2$ za aneuploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} |

Tablica 4.3: Parametri korišteni u modelu.



Slika 4.4: Raspodjela broja stanica za parametre kao u Tablici 4.3.

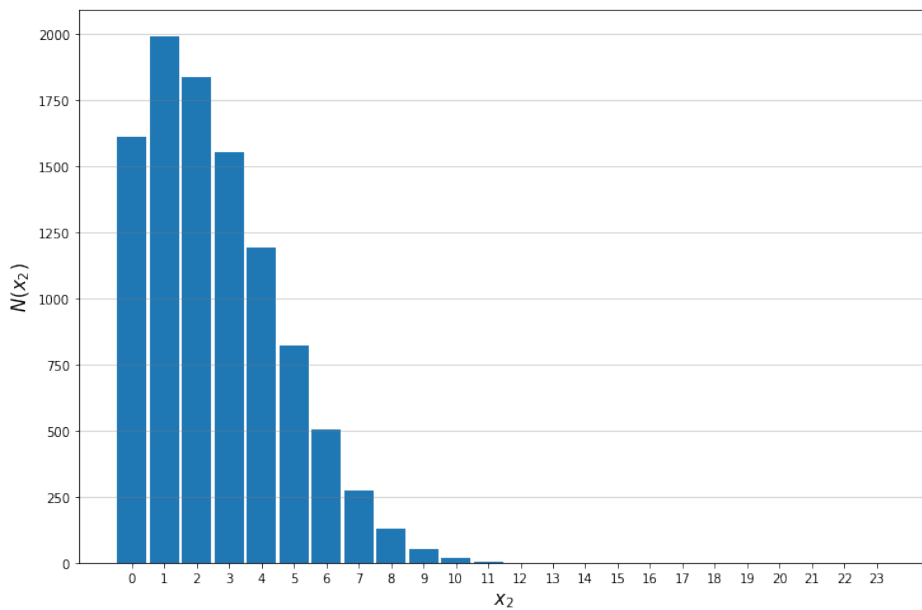
što je vjerojatnost za apoptozu jednaka za sve stanice, dobivamo velik broj aneuploidnih stanica različitih makrokariotipa. Dakle, vjerojatnost apoptoze, sama za sebe,

može bitno utjecati na rezultat.

Ostaje nam još provjeriti kako vjerojatnost za misegregaciju jedne kopije kromosoma, p_0 , utječe na rezultat. Ako p_0 povećamo 6 puta za sve makrokariotipe, a ostale parametre odaberemo kao što je u Tablici 4.4 dobivamo velik broj aneuploidnih stanica, najviše onih sa $x_2 = 1$. Rezultat je prikazan na Slici 4.5.

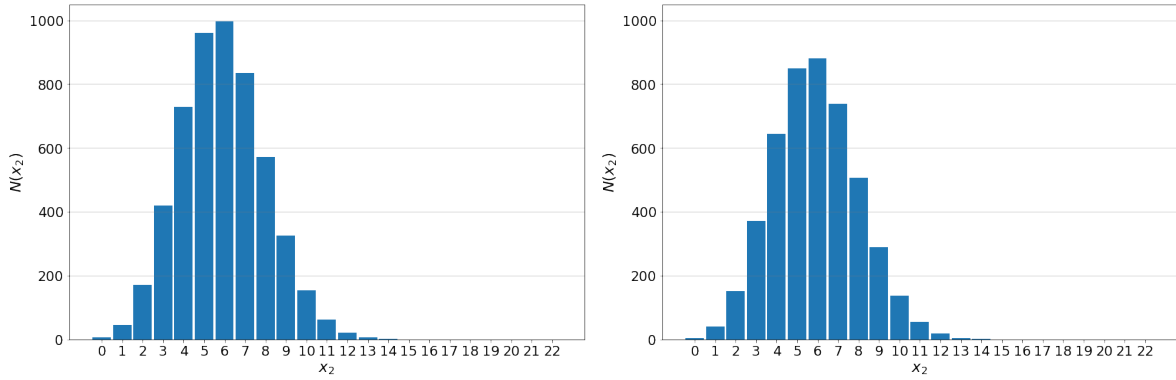
| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|--|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | $6 \cdot 0.0017$ |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $0.8 \ln 2$ za aneuploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} za euploide |
| | $1.25 \cdot 10^{-5}$ za aneuploide |

Tablica 4.4: Parametri korišteni u modelu.



Slika 4.5: Raspodjela broja stanica za parametre kao u Tablici 4.4.

Ono što možemo zaključiti iz gornje analize je da vjerojatnost apoptoze puno više utječe na sustav nego proliferacija stanica. Iako se aneuploidne stanice 20% sporije proliferiraju, uz jednaku vjerojatnost za apoptozu kao i ostale stanice, one će u potpunosti prevladati. Također, povećanjem vjerojatnosti misegregacije jedne kopije kromosoma, prevladavaju aneuploidne stanice neovisno o tome što se proliferiraju sporije i imaju veću vjerojatnost za smrt.



(a) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 1$

(b) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 2$

Slika 4.6: Raspodjela broja stanica za parametre kao u Tablici 4.5.

4.2 Utjecaj specifičnog kromosoma na proliferaciju, apoptozu i misegregaciju

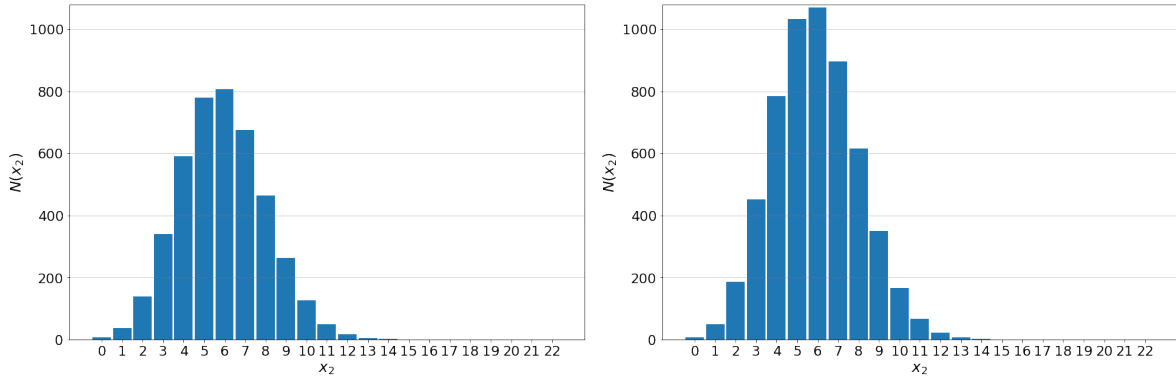
Ono što je iznimno zanimljivo je da u eksperimentima s tumorskim stanicama, nije svejedno na kojem kromosomu imamo višak ili manjak kopija, tj. postoje kromosomi koji imaju jednu ili tri kopije umjesto dvije kopije. Zbog toga smo iz makrokariotipa izdvojili jedan od takvih kromosoma, a radi lakše usporedbe s eksperimentom taj kromosom označavamo kao kromosom 15. Sada nam je cilj vidjeti pod kojim uvjetima dobivamo stanice u kojima se taj 15. kromosom ističe gubitkom jedne kopije. Dakle, želimo, kao i do sada, vidjeti kako nam na rezultat utječe mijenjanje proliferacije i vjerojatnosti za apoptozu stanica koje imaju jednu kopiju kromosoma 15, $c_{15} = 1$.

Za početak, parametre odabiremo kao u Tablici 4.5. Neka se euploidne stanice, dakle, haploidi ($x_2 = 0$, $c_{15} = 1$) i diploidi ($x_2 = 22$, $c_{15} = 2$), te također one stanice koje imaju jednu kopiju kromosoma 15, proliferiraju brže od svih ostalih stanica, dok je vjerojatnost za apoptozu jednaka za sve.

| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|--|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | 0.0017 (preuzeto iz [12]) |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $\ln 2$ za $c_{15} = 1$ |
| | $0.8 \ln 2$ za aneuploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} za sve |

Tablica 4.5: Parametri korišteni u modelu.

Rezultat koji dobivamo prikazan je na Slici 4.6. Iz usporedbe grafova 4.6a i 4.6b vidimo da raspodjela prati sličan trend, iako je broj stanica s jednom kopijom 15.



(a) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 1$

(b) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 2$

Slika 4.7: Raspodjela broja stanica za parametre kao u Tablici 4.6.

kromosoma nešto veći. Ako iz dobivenih rezultata izračunamo udio stanica koje imaju jednu kopiju 15. kromosoma, dobivamo da ih je 53.08 %. Također, zgodno je pogledati koliki je udio kromosoma različitih od 15. s jednom kopijom. Dobivamo da ih je 73.21 %. Dakle, imamo velik broj monosomija, ali kromosom 15. u ovom slučaju ne dolazi do izražaja.

Pokušajmo sada povećati proliferaciju stanica koje imaju samo jednu kopiju kromosoma 15. Odabiremo parametre kao u Tablici 4.6. te dobivamo rezultat prikazan na Slici 4.7.

| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|--|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | 0.0017 (preuzeto iz [12]) |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $1.5 \ln 2$ za $c_{15} = 1$ |
| | $0.8 \ln 2$ za aneuploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} za sve |

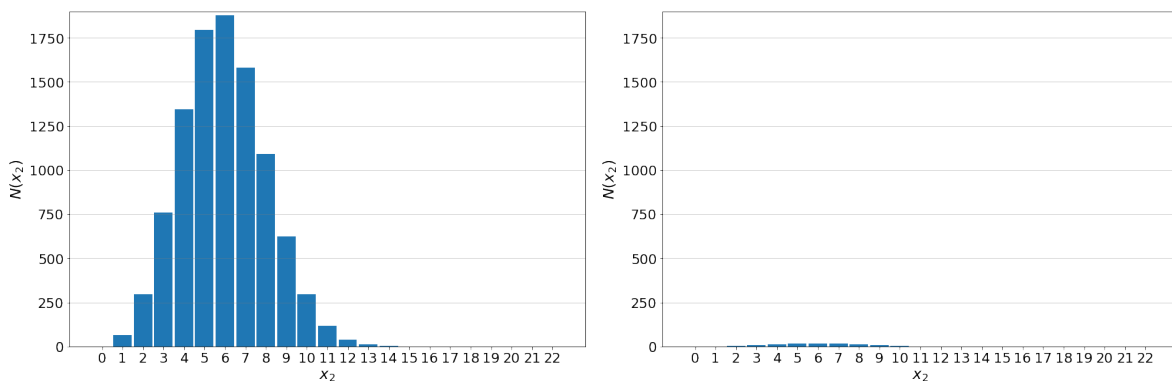
Tablica 4.6: Parametri korišteni u modelu.

Iako bi očekivali da ćemo povećanjem proliferacije stanica s jednom kopijom kromosoma 15, dobiti njihov veći udio, dogodilo se upravo suprotno, udio stanica s $c_{15} = 1$ sada je manji i iznosi 43.0 %. Ovo je direktna posljedica naše definicije brzine apoptoze, k_a , zbog koje povećana proliferacija dovodi do povećanja brzine umiranja stanice.

Zbog toga ćemo pogledati kako povećana proliferacija takvih stanica u kombinaciji sa smanjenom apoptozom utječe na rezultat. Smanjimo li vjerojatnost za apoptozu stanica s jednom kopijom 15. kromosoma uz proliferaciju istu kao i u prethodnom slučaju (Tablica 4.7), dobivamo rezultat prikazan na Slici 4.8.

| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|---|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | 0.0017 (preuzeto iz [12]) |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $1.5\ln 2$ za $c_{15} = 1$ |
| | $0.8\ln 2$ za aneuploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} za euploide |
| | $0.8 \cdot 10^{-5}$ za $c_{15} = 1$ |
| | 10^{-5} za ostale |

Tablica 4.7: Parametri korišteni u modelu.



(a) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 1$

(b) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 2$

Slika 4.8: Raspodjela broja stanica za parametre kao u Tablici 4.7.

Dobili smo da je udio stanica s jednom kopijom kromosoma 15 čak 99.06 %. Dakle, možemo zaključiti da povećana proliferacija takvih stanica tek u kombinaciji sa smanjenom apoptozom daje njihovu potpuno dominaciju. Udio drugih kromosoma s jednom kopijom je također dosta velik i iznosi 72.97 %.

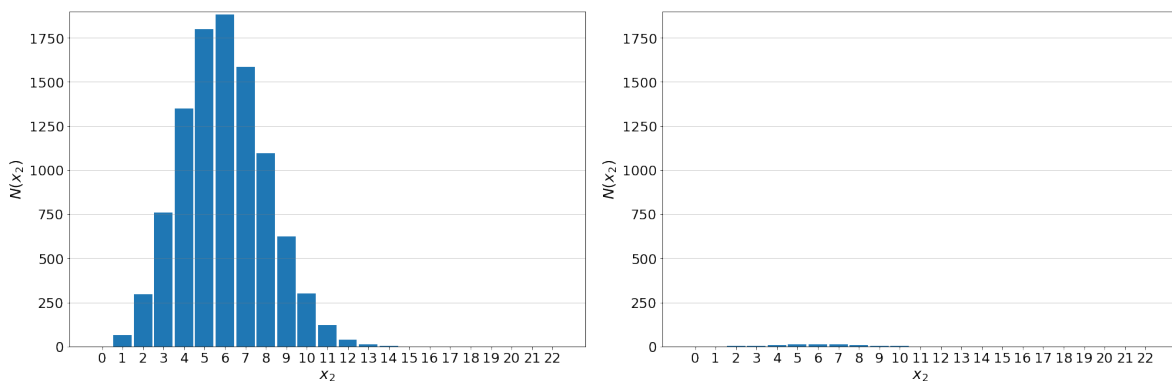
Radi potpunosti možemo još vidjeti koliko jako sama apoptoza utječe na rezultate. Ako se euploidne stanice i stanice s jednom kopijom kromosoma 15 proliferiraju brže od ostalih, a razlikuju se po vjerojatnosti za apoptozu kao u Tablici 4.8, dobivamo rezultat prikazan na Slici 4.9. Udio stanica s jednom kopijom kromosoma 15 sada je još i veći i iznosi 99.37%, dok je udio ostalih monosomija 72.96 %.

Dakle, možemo zaključiti da dominacija stanica s jednom kopijom kromosoma 15, može nastati ili zbog smanjene apoptoze takvih stanica ili zbog smanjene apoptoze u kombinaciji s povećanom proliferacijom.

Preostaje još pogledati što će nam dati drugačija vrijednost vjerojatnosti misegregacije, p_0 . Ako euploidne stanice i stanice s jednom kopijom kromosoma 15 imaju veću proliferaciju od ostalih stanica, a vjerojatnost za smrt jednaku kao i sve ostale stanice, mijenjanjem misegregacije, rezultat se bitno ne mijenja. Stoga ćemo mije-

| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|--|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | 0.0017 (preuzeto iz [12]) |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $\ln 2$ za $c_{15} = 1$ |
| | $0.8 \ln 2$ za aneuploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} za euploide |
| | $0.8 \cdot 10^{-5}$ za $c_{15} = 1$ |
| | 10^{-5} za ostale |

Tablica 4.8: Parametri korišteni u modelu.



(a) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 1$

(b) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 2$

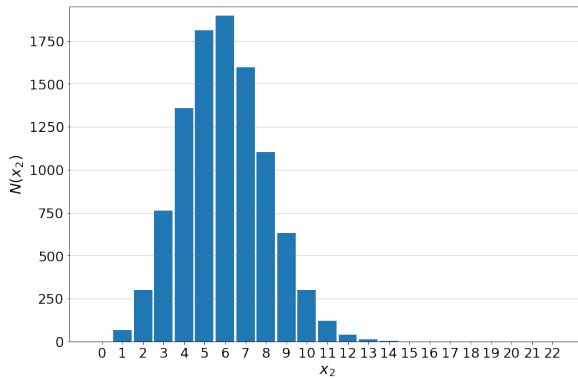
Slika 4.9: Raspodjela broja stanica za parametre kao u Tablici 4.8.

njati vjerojatnost misegregacije, ali i proliferaciju i apoptozu da vidimo možemo li dobiti još veću dominaciju stanica s jednom kopijom kromosoma 15. Smanjimo li misegregaciju 100 puta, a uz ostale parametre kao u Tablici 4.9 dobivamo rezultat prikazan na Slici 4.10.

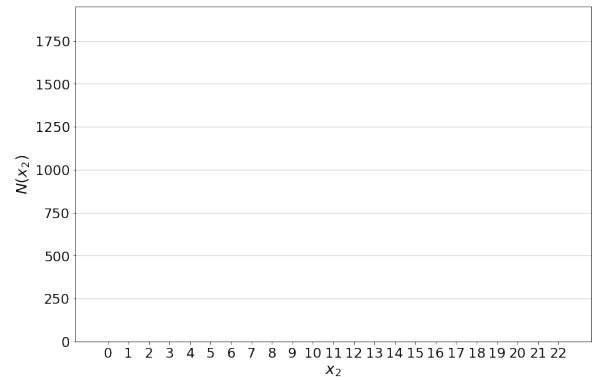
| Parametri | Vrijednosti |
|-----------------------------------|--|
| Vjerojatnost misegregacije, p_0 | $0.01 \cdot 0.0017$ |
| Proliferacija, β | $\ln 2$ za euploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| | $\ln 2$ za $c_{15} = 1$ |
| | $0.8 \ln 2$ za aneuploide (preuzeto iz [17, 18]) |
| Vjerojatnost za apoptozu, p_a | 10^{-5} za euploide |
| | $0.8 \cdot 10^{-5}$ za $c_{15} = 1$ |
| | 10^{-5} za ostale |

Tablica 4.9: Parametri korišteni u modelu.

Sada gotovo sve stanice, njih 99.99 %, ima jednu kopiju kromosoma 15. Ostalih kromosoma s jednom kopijom je i dalje dosta, njih 72.95 %. Dakle, smanjenjem vjerojatnost misegregacije, dobili smo potpunu dominaciju stanica s jednom kopi-



(a) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 1$



(b) Broj kopija kromosoma 15, $c_{15} = 2$

Slika 4.10: Raspodjela broja stanica za parametre kao u Tablici 4.9.

jom kromosoma 15. Ipak, udio ostalih monosomija je također dosta velik. Ono što možemo zaključiti iz ovog razmatranja je da mijenjanje vjerojatnosti misegregacije također može utjecati na evoluciju stanica, ali tek u kombinaciji sa proliferacijom i apoptozom specifičnih kariotipa.

5 Zaključak

Motivirani velikim udjelom aneuploidija u tumorskim stanicama pokušali smo istražiti kako do njih dolazi tijekom evolucije stanica. Da bismo to učinili bilo je potrebno izračunati kako se broj stanica točno određenog kariotipa mijenja u vremenu za što nam je poslužila *rate* jednačba koja u sebi krije procese koji se događaju prilikom diobe, a to su proliferacija, vjerojatnost misegregacije te smrti stanice. Analiza je rađena za najjednostavniji slučaj u kojem kromosomi mogu imati maksimalno dvije kopije. Već tada broj različitih kariotipa bio je dosta velik. Zbog toga smo obogatili naš model uvodeći novi koncept, makrokariotip. Njime smo izgubili informacije o svakom pojedinom kromosomu, ali smo znatno smanjili dimenziju prostora s $2^{23} \approx 8 \cdot 10^6$ na samo 24. Budući da nas je zanimao odrasli organizam kod kojeg većina tkiva zadržava konstantan broj stanica, prigodno je bilo tražiti stacionarno rješenje gore spomenute *rate* jednačbe. Time nam se problem sveo na rješavanje svojstvene jednačbe. Detaljnom analizom parametarskog prostora istražili smo kako proliferacija, misegregacija te apoptoza utječu na sustav. Zaključili smo da apoptoza, sama za sebe, utječe na sustav puno više nego proliferacija. Nadalje, rezultati su pokazali da će aneuploidne stanice, s jednakom vjerojatnosti za apoptozu kao i euploidne stanice, u potpunosti prevladati iako se 20 % sporije dijele. Također, povećanjem vjerojatnosti misegregacije jedne kopije kromosoma, prevladavaju aneuploidne stanice neovisno o tome što se proliferiraju sporije i imaju veću vjerojatnost za smrt. Osim toga, eksperimenti pokazuju da nije svejedno na kojem kromosomu imamo višak ili manjak kopija, tj. neki od kromosoma se uvijek ističu. Zbog toga smo proširili naš model tako što smo iz makrokariotipa izdvojili jedan od takvih kromosoma, kromosom 15. Cilj nam je bio vidjeti pod kojim uvjetima dobivamo stanice u kojima se taj 15. kromosom ističe gubitkom jedne kopije. Ono što smo zaključili je da dominacija stanica s jednom kopijom kromosoma 15, može nastati ili zbog smanjene apoptoze takvih stanica ili zbog smanjene apoptoze u kombinaciji s povećanom proliferacijom. Mijenjanje misegregacije jedne kopije kromosoma također utječe na rezultate, ali tek u kombinaciji s određenom proliferacijom i apoptozom stanica s jednom kopijom kromosoma 15.

Značajan udio tumora u ljudi ima vrlo velik broj kopija kromosoma, od kariotipa bliskih triploidnim stanicama do kariotipa bliskih tetraploidnim stanicama. To nas

navodi na zaključak da je malo vjerojatno da je samo misegregacija pojedinačnih kromosoma odgovorna za tako abnormalne kariotipe (Ganem et al., 2007, Storchova and Kuffer, 2008, Davoli and de Lange, 2011.). Puno je vjerojatnije da takvi tumori nastaju prilikom tetraploidizacije koja je popraćena čestim gubicima kromosoma (Shackney et al., 1989). Stoga bi se model mogao proširiti tako da se u njega uključi i mogućnost tetraploidizacije, tj. duplikacije cijelog genoma, kao jednog od procesa koji stanica može doživjeti tijekom diobe. To automatski zahtjeva proučavanje većeg broja kopija kromosoma što je svakako smjer u kojem se ovaj model može značajno razvijati.

Bibliography

- [1] Ben-David, U., and Amon, A. (2019). Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nature Reviews Genetics* 21, 44–62. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0171-x>.
- [2] Sheltzer, J. M. et al. Single-chromosome gains commonly function as tumor suppressors. *Cancer Cell* 31, 240–255 (2017).
- [3] Ben-David, U. et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat. Genet.* 49, 1567–1575 (2017).
- [4] Taylor, A. M. et al. Genomic and functional approaches to understanding cancer aneuploidy. *Cancer Cell* 33, 676–689.e3 (2018).
- [5] Santaguida, S. and Amon, A. Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 473–485 (2015).
- [6] Sheltzer, J. M. A transcriptional and metabolic signature of primary aneuploidy is present in chromosomally unstable cancer cells and informs clinical prognosis. *Cancer Res.* 73, 6401–6412 (2013)
- [7] Williams, B. R. et al. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science* 322, 703–709 (2008).
- [8] Torres, E. M. et al. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* 317, 916–924 (2007).
- [9] Ben-David, U. et al. Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 5, 4825 (2014).
- [10] National Human Genome Research Institute, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Karyotype>, 23.01.2022.
- [11] Cao, Y. et al. False Negative Cell-Free DNA Screening Result in a Newborn with Trisomy 13 (27.1.2016.), https://www.researchgate.net/publication/295682067_False_Negative_Cell-Free_DNA_Screening_Result_in_a_Newborn_with_Trisomy_13, 31.9.2022.

- [12] Ban, I.; Tomasic, L., Trakala, M., Tolic, I., Pavin, N.: Proliferative advantage of specific aneuploid cells drives evolution of tumor karyotypes, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.14.488382v3>, 7.7.2022.
- [13] Gusev, Y., Kagansky, V., and Dooley, W.C. (2000). A Stochastic Model of Chromosome Segregation Errors with Reference to Cancer Cells. *Mathematical and Computer Modelling* 32, 97–111. [https://doi.org/10.1016/S0895-7177\(00\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0895-7177(00)00122-9).
- [14] Araujo, A., Baum, B., and Bentley, P. (2013). The Role of Chromosome Missegregation in Cancer Development: A Theoretical Approach Using Agent-Based Modelling. *PLOS ONE* 8, e72206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072206>.
- [15] Cooper, G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- [16] Petrie, H.T., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual Review of Immunology* 25, 649–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115715>.
- [17] Hintzen, D.C., Soto, M., Schubert, M., Bakker, B., Spierings, D.C., Szuhai, K., Lansdorp, P.M., Foijer, F., Medema, R.H., and Raaijmakers, J.A. (2021). Monosomies, trisomies and segmental aneuploidies differentially affect chromosomal stability. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.08.31.458318>.
- [18] Williams, B.R., Prabhu, V.R., Hunter, K.E., Glazier, C.M., Whittaker, C.A., Housman, D.E., and Amon, A. (2008). Aneuploidy Affects Proliferation and Spontaneous Immortalization in Mammalian Cells. *Science* (1979) 322, 703–708. <https://doi.org/10.1126/science.1160058>
- [19] Bakhom, S.F., Genovese, G., and Compton, D.A. (2009). Deviant Kinetochores Underlie Chromosomal Instability. *Current Biology* 19, 1937–1942. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.055>.

- [20] Cimini, D. (2008). Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1786, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.05.003>.
- [21] Dewhurst, S.M., McGranahan, N., Burrell, R.A., Rowan, A.J., Grönroos, E., Endesfelder, D., Joshi, T., Mouradov, D., Gibbs, P., Ward, R.L., et al. (2014). Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution. *Cancer Discovery* 4, 175–185. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0285>.
- [22] Nicholson, J.M., Macedo, J.C., Mattingly, A.J., Wangsa, D., Camps, J., Lima, V., Gomes, A.M., Ried, T., Logarinho, E., and Cimini, D. (2015a). Chromosome mis-segregation and cytokinesis failure in trisomic human cells. *ELIFE* 4, e05068. <https://doi.org/10.7554/eLife.05068>.
- [23] Thompson, S.L., and Compton, D.A. (2011b). Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17974–17978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109720108>.
- [24] Ganem N.J., Storchova Z., Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17:157–162.
- [25] Storchova Z., Kuffer C. The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci.* 2008;121:3859–3866.
- [26] Davoli T., de Lange T. The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:22.1–22.26.
- [27] Shackney S.E., Smith C.A., Miller B.W., Burholt D.R., Murtha K., Giles H.R., Ketterer D.M., Pollice A.A. Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res.* 1989;49:3344–3354.