

Proučavanje uloge toka mikrotubula u centriranju kromosoma u diobenom vretenu tijekom mitoze

Božan, Domagoj

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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:217:862890>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Fizički odsjek

Domagoj Božan

**Proučavanje uloge toka mikrotubula u
centriranju kromosoma u diobenom vretenu
tijekom mitoze**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Fizički odsjek

Domagoj Božan

**Proučavanje uloge toka mikrotubula u
centriranju kromosoma u diobenom vretenu
tijekom mitoze**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2024



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Physics

Domagoj Božan

Studying the role of microtubule flux in chromosome centering on the mitotic spindle

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Professor Nenad Pavin, PHD

Zagreb, 2024

Informacije o mentoru

Nenad Pavin rođen je 5. svibnja 1967. u Rijeci. Osnovnoškolsko obrazovanje započinje 1974. godine u Rijeci, a završava ga 1982. godine u Zadru, gdje također završava i srednju školu 1986. godine. Upisuje studij fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje 1993. godine stječe zvanje diplomirani inženjer fizike, a 1998. godine na poslijediplomskom studiju zvanje magistar fizike. Doktorsku disertaciju pod naslovom "Kaotični tranzijenti u novoj populacijskoj jednadžbi s rupom i njihov odraz na fraktalnu strukturu Arnoldovih jezika" izrađuje pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Vladimira Paara na istom fakultetu te ju brani 1999. godine. Profesionalnu karijeru započinje na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje od 1993. do 2001. godine radi kao znanstveni novak na problemima iz teorije kaosa te se od 2001. godine na istom odsjeku zapošljava kao docent. 2007. godine odlazi na znanstveno usavršavanje na Max Planck Institut za fiziku kompleksnih sustava u Dresdenu, gdje četiri godine boravi kao gostujući znanstvenik kod prof. dr. sc. Franka Jülichera. Za vrijeme tog boravka svoj znanstveni interes proširuje na proučavanje fizikalnih procesa važnih za razumijevanje stanične biologije.

Ukupno je objavio 56 radova, od čega je 49 u časopisima zastupljenim u Current Contents (CC). Među njima ističu se radovi objavljeni u časopisima velikog faktora utjecaja (impact factor): Cell (IF 33.116) - 2 rada, Nature Cell Biology (IF 20.058) - 1 rad, Nature Communications (IF 12.124) - 2 rada, Current Biology (IF 10.834) - 1 rad, Annual Review of Biophysics (IF 10.676) - 1 rad, Developmental Cell (IF 9.174) - 2 rada, Cell Reports (IF 9.995) - 1 rad, Physical Review Letters (IF 7.645) - 2 rada. Pod njegovim vodstvom izrađeno je 7 doktorskih disertacija i 11 diplomskih radova. Održao je više od 25 predavanja na međunarodnim znanstvenim skupovima i znanstvenim institutima. Kao voditelj ili suradnik sudjelovao je u izvođenju niza projekata, neki od kojih su 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) i ERC Synergy "Molecular origins of aneuploidies in healthy and diseased human tissues (Aneuploidy)" (iznos 10.000.000 EUR).

Dobitnik je Državne nagrade za znanost za 2015. godinu, kao i Nagrade Europskog društva

za mikroskopiju za izvanredan članak u kategoriji znanost 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 glavni seniorski istraživač.

Sudjelovao je u nastavi održavanjem predavanja za sedam predmeta na dodiplomskom studiju, dva 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. godine, a čiji je voditelj bio do 2000. do 2005. godine.

Zahvale

Zahvaljujem se svome mentoru, Nenadu Pavinu, na danoj prilici da radim na ovome projektu, kao i na pomoći tijekom doktorskog studija i pri izradi doktorskog rada.

Zahvaljujem se svim članovima Pavin grupe za podršku pri radu. Također se zahvaljujem Ivi Tolić i članovima njenog laboratorija na suradnji tijekom rada na projektu i pomoći pri pisanju članaka,

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, Ljiljani i Anti, svojoj sestri Marini i svojoj djevojci Nini na pruženoj podršci i strpljenju tijekom ovih godina na doktorskome studiju.

Sažetak

Mitoza je proces podjele stanice majke u dvije identične stanice kćeri te se tradicionalno dijeli na pet faza: profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu. Tijekom prometafaze, kromosomi se gibaju unutar stanice u procesu zvanom kongresija sve dok ne postignu pravilnu bipolarnu orijentaciju na metafaznoj ravnini. Nakon toga stanica ulazi u metafazu, gdje se kromosomi centriraju na ekvatoru diobenog vretena. Procesi koji se odvijaju tijekom prometafaze i metafaze utječu na ispravno poravnanje kromosoma i stoga su od velikog značaja za ispravno daljnje provođenje mitoze. Diobeno se vreteno sastoji od dva pola na kojima se nukleiraju mikrotubuli. Interakcije mikrotubula i kinetohora te sile koje generiraju proteini ono su što vodi gibanje kromosoma.

Kinetohorni mikrotubuli pod utjecajem su sila koje vode njihov tok usmjeren prema polu (eng. *poleward flux*). U ovom je radu razvijen model centriranja kromosoma u diobenom vretenu tijekom mitoze pomoću toka mikrotubula usmjerenog prema polu, koji se primjenjuje na prometafazu i metafazu. Model se sastoji od jednog para sestrinskih kinetohora izmaknutih iz središta diobenog vretena na koje se vežu kinetohorni mikrotubuli koji stvaraju paralelne i antiparalelne preklope s prenosnim mikrotubulima. Unutar tih preklopa vežu se proteini koji generiraju sile ovisne o duljini mikrotubula koje vode njihov tok. Ravnoteža sila u modelu utječe na brzine toka kinetohornih mikrotubula i brzine kinetohora.

Rezultati modela za metafazu pokazuju da se kinetohore približavaju središtu diobenog vretena unutar nekoliko minuta. Model također daje ključno i jedinstveno predviđanje da su za kinetohore izmaknute iz središta duži kinetohorni mikrotubuli podvrgnuti bržem toku od kraćih. Model za prometafazu uvodi i razliku u broju kinetohornih mikrotubula na sestrinskim kinetohorima, gdje se kraći mikrotubuli nalaze u većem broju. Rezultati ovog modela pokazuju da će sile na manjem broju duljih kinetohornih mikrotubula nadjačati sile na većem broju kraćih i time uzrokovati gibanje kromosoma prema metafaznoj ravnini, odnosno kongresiju.

Ključni pojmovi: mitoza, prometafaza, metafaza, kongresija, centriranje, kromosomi, mikrotubuli, tok mikrotubula prema polu, motorni proteini

Abstract

Mitosis is the process in which one mother cell is divided into two identical daughter cells and it is traditionally divided into five phases: prophase, prometaphase, metaphase, anaphase and telophase. During prometaphase, chromosomes move within the cell in a process named congression until they reach proper bipolar orientation on the metaphase plate. After that the cell enters metaphase, where the chromosomes center on the mitotic spindle equator. Processes occurring during prometaphase and metaphase affect the proper alignment of chromosomes and are therefore of great importance for proper completion of mitosis. The mitotic spindle consists of two poles on which microtubules are nucleated. The interactions between microtubules and kinetochores, as well as forces generated by proteins are what drives chromosome movement.

Kinetochores are subject to forces driving their poleward flux. In this paper a model for chromosome centering in the mitotic spindle through microtubule poleward flux has been developed and applied to prometaphase and metaphase. The model consists of one pair of sister kinetochores placed away from the mitotic spindle center onto which kinetochore microtubules are attached, forming parallel and antiparallel overlaps with bridging microtubules. Within those overlaps proteins accumulate and generate length-dependent forces driving microtubule poleward flux. The balance of forces in the model affects kinetochore microtubule flux and kinetochore velocities.

The results of the metaphase model show that kinetochores approach the mitotic spindle center in several minutes. The model also presents a key unique prediction that for kinetochores placed away from the center longer kinetochore microtubules have greater poleward flux than shorter ones. The prometaphase model introduces a difference in number of kinetochore microtubules on the sister kinetochores, where the number of shorter microtubules is greater. The results of this model show that the forces on lesser number of longer kinetochore microtubules will overpower the forces on greater number of shorter ones and thus cause chromosome movement towards the metaphase plate, or in other words, congression.

Keywords: mitosis, prometaphase, metaphase, congression, centering, chromosomes, microtubules, microtubule poleward flux, motor proteins

Extended abstract

Introduction

During their growth, eukaryotic cells go through the phases of the cellular cycle. The S phase of the cellular cycle, or mitosis, is of particular interest as it is in this phase that cell division occurs. Mitosis is traditionally divided into five phases: prophase, prometaphase, metaphase, anaphase and telophase. During prometaphase, chromosomes move within the cell in a process named congression until they reach proper bipolar orientation on the metaphase plate. After that the cell enters metaphase, where the chromosomes center on the mitotic spindle equator. Processes occurring during prometaphase and metaphase affect the proper alignment of chromosomes at the mitotic spindle equator and are therefore of great importance for proper completion of mitosis. Irregular chromosome alignment extends the duration of mitosis and often leads to errors in cell division, which is a hallmark of several types of cancer. For that reason, it is important to study the components of the cytoskeleton participating in the processes occurring during the prometaphase and metaphase of mitosis, as well as the forces driving these processes.

The mitotic spindle consists of two poles on which microtubules, hollow cylindrical polymers, are nucleated. Microtubules can grow in a process named polymerization or shorten in the process of depolymerization and they can transition from one process to another at any moment. The transition from polymerization to depolymerization is termed catastrophe and the opposite process is called rescue. These dynamic properties of microtubules are necessary for the mitotic spindle formation. Growing microtubules can attach to chromosomes through protein complexes called kinetochores and in that way become kinetochore microtubules. Microtubules that do not attach to kinetochores, or non-kinetochore microtubules, can grow towards the mitotic spindle center and form antiparallel overlaps with microtubules extending from the opposite pole and we term these microtubules interpolar microtubules. If interpolar microtubules connect kinetochore microtubules attached to neighboring, or sister, kinetochores, we term them bridging microtubules. A bundle of kinetochore microtubules forms the kinetochore fiber and a bundle of bridging microtubules the bridging fiber. Motor proteins can attach

to microtubules, slide and crosslink them. In this way, motor proteins generate forces in the mitotic spindle.

Physical mechanisms in the spindle

Forces oriented towards the mitotic spindle equator are necessary for chromosome alignment and thus the proper completion of mitosis. Various models have been proposed in order to describe the origin of those forces. Previous models include polar ejection forces which decrease with chromosome distance from the poles, pulling forces on the kinetochores caused by plus-end kinetochore microtubule depolymerization, as well as length-dependent microtubule catastrophe affecting the forces in the mitotic spindle. All these effects simultaneously contribute to chromosome alignment. However, this is not the complete description of forces acting on chromosomes.

Kinetochore fibers are subject to forces driving their poleward flux, a conveyor belt-like movement of the kinetochore fibers towards the pole as the microtubule minus-ends depolymerize and plus-ends polymerize. This process is driven and regulated by several different motor proteins. Electric microscopy of kinetochore fibers has led to the idea that poleward flux is driven by sliding between kinetochore fibers and bridging fibers. This and other studies have led to the conclusion that chromosome alignment, bridging fiber overlaps and poleward flux are mutually connected. For that reason the model for chromosome centering during the metaphase through poleward flux, as well as the model for chromosome congression during the prometaphase through poleward flux have been developed and are presented in this thesis.

Model for chromosome centering during the metaphase

The first model presented in this thesis is the model for chromosome centering during the metaphase driven by poleward flux, as this model is simpler. The central idea of the model is that kinetochores are centered by pulling forces proportional to the length of overlaps between bridging and kinetochore fibers and generated by active motore proteins and passive crosslinkers. When kinetochores are placed away from the mitotic spindle center the difference in length of sister kinetochore fibers causes a difference in length of antiparallel overlaps on each side of the kinetochore and through that a difference in number of accumulated motor proteins on each side, leading to the generation of a centering force on the kinetochores. The difference in length of parallel overlaps and the number of passive crosslinkers on each side also lead to kinetochore centering. Thus, kinetochores in this model are centered through the balance of forces on sister kinetochore fibers, which is different from preexisting models based on kinetochore fiber plus-end dynamics and polar ejection forces.

The model consists of one pair of sister kinetochores placed away from the mitotic spindle

center. The elastic bond between the sister kinetochores is modeled as a rigid spring and the kinetochores always move as a single object. One kinetochore fibers extends from each spindle edge and attaches to one of the sister kinetochore. Similar to that, one bridging fiber extends from each spindle edge and extends towards the opposing side. Kinetochore and bridging fibers form parallel and antiparallel overlaps. Active motor proteins accumulate in antiparallel overlaps and passive crosslinkers accumulate in parallel overlaps. Total sliding forces generated by motor proteins are given as a product of their density, the length of the antiparallel overlap and the force of a single motor protein, which is in a force-velocity relation with the poleward flux velocities of bridging and kinetochore fibers. Analogously, the total forces of passive crosslinkers are given as a product of their density, the length of the parallel overlap and the force of a single crosslinker, which is a friction-like force in direct relation to the poleward flux velocities of bridging and kinetochore fibers. The force exerted by microtubule plus-ends on the kinetochores is also modeled as friction dependant on the velocities of the kinetochore and kinetochore fiber poleward flux. This force and the forces generated by passive crosslinkers are opposed to the forces generated by motor proteins. By introducing an approximation in which the bridging fiber poleward flux velocity is constant and equal to half the motor protein sliding velocity, we can use this balance of forces to solve the model and obtain the expressions for poleward flux velocities of each kinetochore fiber, as well as the kinetochore centering velocity.

By inputting parameters typical for real cells into the model we can study the efficiency of the model for kinetochore centering. The results show that initially displaced kinetochore approach the mitotic spindle center in several minutes and therefore the model can successfully replicate chromosome centering during metaphase. The model also gives two key and unique predictions - kinetochore fiber poleward flux is always slower than bridging fiber poleward flux and the longer kinetochore fiber has greater flux than the shorter one. We also change the parameters in the model to study the parameter space and observe how those changes affect kinetochore centering. We compare the predictions with experimental results obtained by our collaborators in order to test their validity. The theory and experiment show great agreement as the experimental results confirm all the prediction of the model. We also solve the model without the bridging fiber flux poleward flux velocity approximation and observe negligible changes in the results, confirming the validity of the approximation.

Model for chromosome congression during the prometaphase

The second model presented in this thesis describes poleward flux driven chromosome congression during the prometaphase. As chromosome congression during the prometaphase and chromosome centering during the metaphase are similar processes, it follows naturally that the model for chromosome centering could also be applied here. However, some changes in the

model are necessary to describe the differences in the mitotic spindle between prometaphase and metaphase. Some parameters need to be changed to match these differences, such as the kinetochore initial position, the size of mitotic spindle and the length of the overlaps. The biggest difference, however is that during the prometaphase the number of kinetochore microtubules attached to each sister kinetochore differ as the shorter kinetochore microtubules come in greater number than the longer ones. The expression for forces in the spindle and their balance are similar to the model for chromosome centering during the metaphase and so we once again solve the model to obtain the expressions for kinetochore and kinetochore microtubule poleward flux velocities.

The results show that the forces generated on the lesser number of longer kinetochore microtubules will overpower the forces generated on the greater number of shorter ones and the kinetochores move towards the spindle center. However, they do not reach the center but stop at a fixed point away from it. The reason for this is that in this model the number of kinetochore microtubules does not change in time, while in real cells the number of kinetochore microtubules attached to each kinetochore becomes equal as they congress. By taking this fact into account and solving the model for different ratios of kinetochore microtubules on each kinetochore, the results show that kinetochore reach a biologically relevant final position for congression, successfully reproducing chromosome congression. This model also gives an additional prediction and that is that for a great enough number of shorter kinetochore microtubules the kinetochore will not move towards the center but rather towards the nearer pole. This can explain cases in real cells where some chromosomes remain near the poles and do not congress.

Discussion

The models presented in this thesis successfully replicate both chromosome congression during the prometaphase and chromosome centering during the metaphase. The results give predictions unique to this model and show that the difference in poleward flux of sister kinetochore fibers is a key mechanism for chromosome alignment during mitosis. This previously unexplored mechanism can, independently of other previously known mechanisms, affect chromosome alignment during mitosis and by studying this mechanism it is possible to gain insight into processes ensuring proper cell division, as well as processes interfering with proper completion of mitosis, causing various diseases and disorders.

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Mitoza	1
1.2	Struktura diobenog vretena	3
1.2.1	Mikrotubuli i kinetohore	4
1.2.2	Motorni proteini	6
2	Fizikalni mehanizmi u diobenom vretenu	8
2.1	Proučavanje i modeliranje mehanobiologije diobenog vretena	8
2.2	Dinamika mikrotubula u diobenom vretenu	10
2.3	Sile na kromosome u metafazi	11
2.4	Tok mikrotubula usmjeren prema polu	12
3	Model za centriranje kromosoma u metafazi	14
3.1	Sile u modelu	14
3.2	Aproksimacije korištene pri rješavanju modela	18
3.3	Računanje brzina kinetohornih vlakana i kinetohora	19
3.4	Parametri u diobenom vretenu tijekom metafaze	22
3.5	Rezultati modela	23
3.6	Usporedba modela s eksperimentom	30
3.7	Model bez aproksimacija	32
3.8	Usporedba modela s i bez aproksimacija	41
4	Model za kongresiju kromosoma u prometafazi	45
4.1	Sile u modelu	45
4.2	Računanje brzina kinetohornih mikrotubula i kinetohora	47
4.3	Parametri u diobenom vretenu tijekom prometafaze	53
4.4	Rezultati modela	54
5	Diskusija i zaključak	65
	Životopis	77

Poglavlje 1

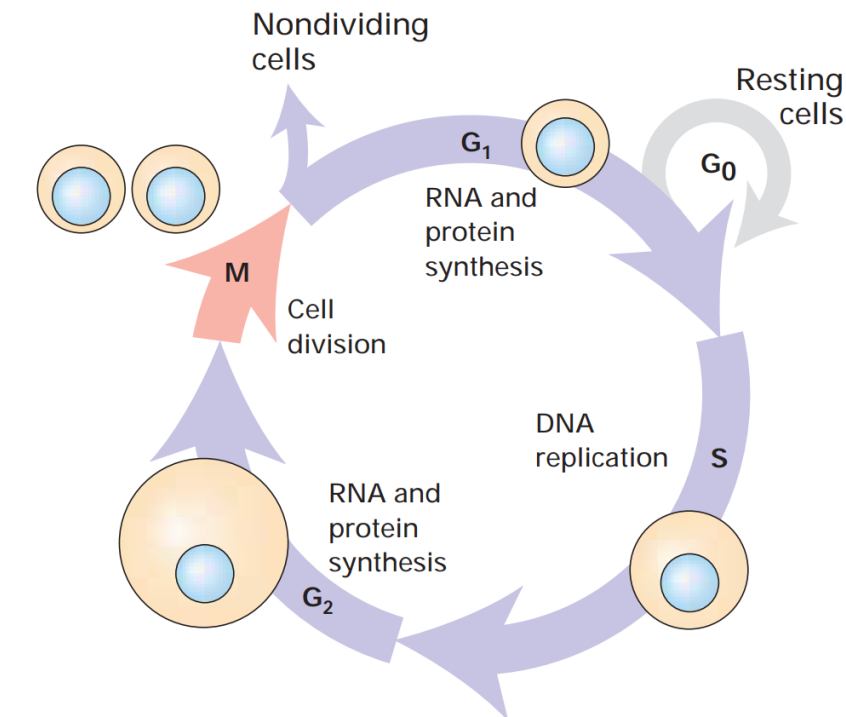
Uvod

U ovoj se doktorskoj disertaciji prezentira model toka mikrotubula u diobenom vretenu tijekom mitoze. Opisuju se sile aktivnih i pasivnih proteina koji djeluju u diobenom vretenu i uzrokuju tok mikrotubula usmjeren prema polovima. Tok mikrotubula utječe na gibanje kromosoma te potpomaže njihovom centriranju u prometafazi i metafazi mitoze. Centriranje kromosoma je iznimno važan aspekt procesa diobe stanica jer nepravilna provedba ovog procesa može dovesti do šteta u novonastalim stanicama koje mogu eventualno uzrokovati brojne poremećaje i bolesti. U poglavlju Uvod opisuje se stanični ciklus, s naglaskom na proces mitoze, prometafazu i metafazu, struktura citoskeleta, točnije mikrotubuli i aktivnih i pasivni proteini, te sile u diobenom vretenu koje utječu na gibanje kromosoma. U poglavlju Modeli i rezultati predstavljaju se modeli poravnanja kromosoma u metafazi te kongresije kromosoma u prometafazi preko toka mikrotubula. Naposljetku, u poglavlju Diskusija i zaključak dan je pregled rezultata modela, njihov značaj za polje biofizike, te postupci kojima bi se model mogao unaprijediti u budućnosti.

1.1 Mitoza

Tijekom svog rasta, eukariotske stanice prolaze kroz faze staničnog ciklusa. Stanični je ciklus slijed događaja koji pripremaju stanicu za podjelu, te na kraju kulminiraju samim procesom podjele, odnosno mitozom, a tradicionalno se sastoji od četiri faze (Slika 1.1). Prve tri faze staničnog ciklusa, G1, S i G2, kolektivno se nazivaju i interfaza. G1 i G2 faze nalaze se između S faze i mitoze, a tijekom njih se sintetiziraju mRNK i proteini. Pod određenim uvjetima, kao što su manjak nutrijenata ili ako je postignuta konačna veličina tkiva, stanica može izaći iz ciklusa i ući u stanje pauze koje se naziva G0, ali većina se stanica može ponovno vratiti u ciklus ako se uvjeti promijene. U S fazi dolazi do replikacije kromosoma i DNK koju oni nose.

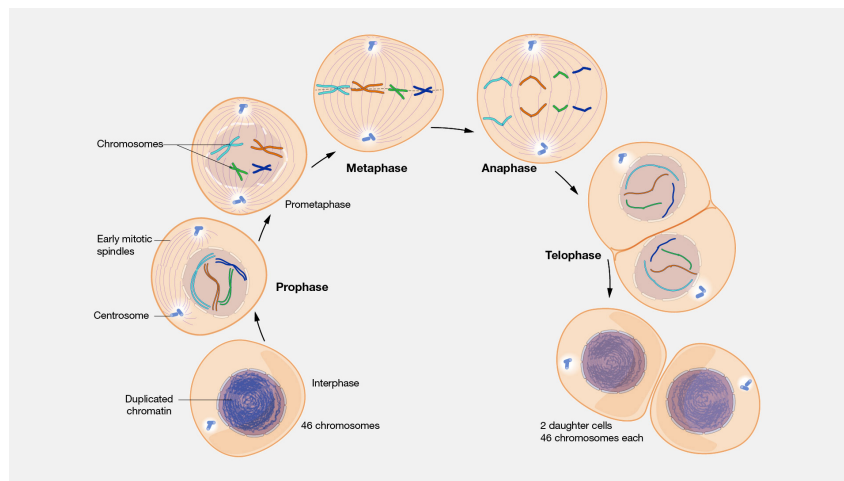
Kromosomi replicirani u S fazi naposljetku ulaze u M fazu, odnosno mitozu [54].



Slika 1.1: Grafički prikaz četiri faze staničnog ciklusa. Slika je preuzeta iz [54].

Mitoza je proces podjele stanice majke u dvije identične stanice kćeri, a provodi se u svim eukariotskim stanicama [62]. Detalji mitoze mogu se razlikovati među organizmima, ali temeljni proces je održan kod svih eukariota. Tijekom ovog procesa dolazi do kondenzacije kromosoma, razgradnje jezgrine membrane kod većine stanica te reorganizacije citoskeleta stanice kako bi se stvorilo diobeno vreteno s mikrotubulima na koje se vežu kromosomi. Kromatide kromosoma tada se odvajaju i gibaju prema suprotnim polovima diobenog vretena, nakon čega slijedi formacija dviju jezgara kćeri [15]. Mitoza se tradicionalno dijeli na pet faza - profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu (Slika 1.2). Karakteristika profaze je proces kondenzacije DNK u kromosome. Kondenzirane sestrinske kromatide kromosoma drže se zajedno u području centromere, gdje se vežu specifični proteini koji formiraju kinetohore, mjesta vezanja mikrotubula diobenog vretena. Izvan jezgre, centrosomi duplicirani u interfazi se razdvoje te predstavljaju dva pola diobenog vretena koje se zatim formira između njih u kasnoj profazi. Nakon završetka profaze, stanica ulazi u prijelazni period koji se naziva prometafaza. Prometafaza započinje naglim raspadom jezgrine membrane, što dozvoljava vezivanje mikrotubula diobenog vretena na kinetohore kromosoma. Kromosomi se gibaju unutar stanice u procesu zvanom kongresija sve dok ne ostvare pravilnu bipolarnu orijentaciju u metafaznoj

ravnini, što znači da su kinetohore sestrinskih kromatida vezane mikrotubulima na suprotne polove diobenog vretena. Nakon toga stanica ulazi u metafazu, gdje se kromosomi centriraju na ekvatoru diobenog vretena. Prelazak iz metafaze u anafazu događa se razdvajanjem sestrinskih kromatida u samostalne kromosome koji se zatim gibaju prema suprotnim polovima diobenog vretena. U posljednjoj fazi mitoze, telofazi, kromosomi na polovima se dekondenziraju i oko svakog seta se ponovno formira jezgra stanice. Kroz kasnu anafazu i telofazu se također odvija i proces citokineze, gdje se citoplazma stanice dijeli u dva dijela i nastaju dvije nove stanice kćeri, svaka sa svojom jezgrom i ponovno u stadiju interfaze [3, 15, 73].



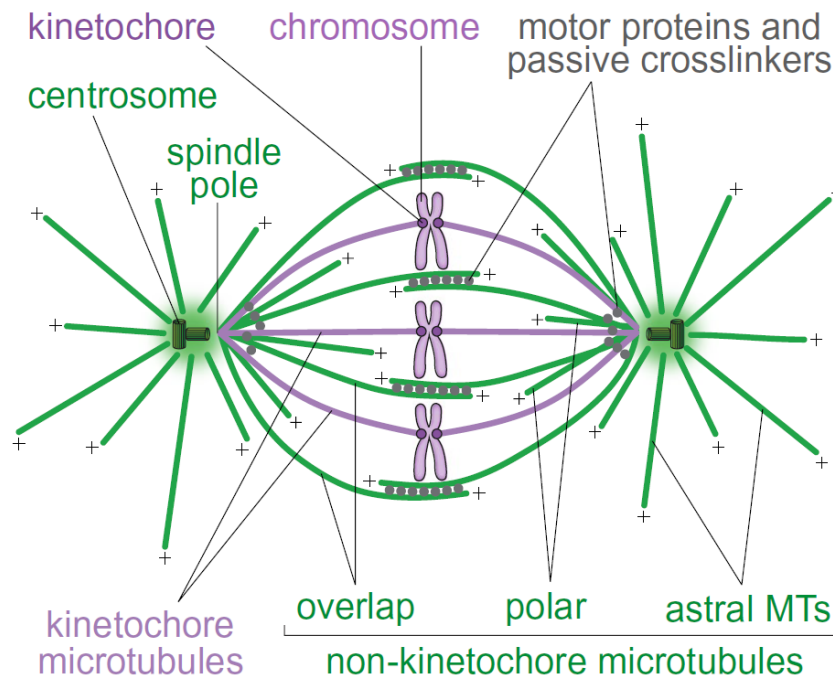
Slika 1.2: Grafički prikaz faza mitoze. Slika je preuzeta iz [29].

Procesi koji se odvijaju tijekom prometafaze i metafaze mitoze utječu na ispravno poravnanje kromosoma u središtu diobenog vretena i stoga su od velikog značaja za ispravno daljnje provođenje mitoze [22, 57]. Neispravno poravnanje kromosoma produljuje trajanje mitoze i često dovodi do greški u podjeli stanice, kao što je aneuploidija - stanje pogrešnog broja kromosoma u stanici, što je karakteristika brojnih vrsta raka, pobačaja i genetskih poremećaja poput Downovog sindroma [30, 37, 48, 51, 80, 87, 95, 104]. Iz tog je razloga važno detaljnije proučiti komponente citoskeleta koje sudjeluju u procesima koji se odvijaju tijekom prometafaze i metafaze te sile koje vode te procese.

1.2 Struktura diobenog vretena

Diobeno je vreteno mikrostruj koji se na početku mitoze samostalno formira i u kasnijim fazama mitoze generira sile potrebne za pozicioniranje kromosoma [47, 56, 75, 76]. Sastoji se od dva pola (centrosoma) na kojima se nukleiraju mikrotubuli. Ti mikrotubuli zatim rastu te se mogu

uhvatiti za kinetohore, proteinske komplekse na kromosomima (Slika 1.3). Ukoliko se ne uhvate za kromosome, mikrotubuli mogu nastaviti rasti prema suprotnom polu ili rubu stanice [97].



Slika 1.3: Pojednostavljeni prikaz diobenog vretena. Slika je preuzeta iz [97].

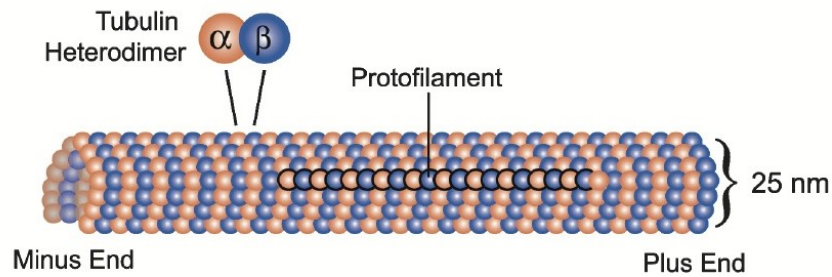
U diobenom vretenu nalaze se i motorni proteini. Ti se proteini vežu na mikrotubule te se gibaju po njima. Gibanje motornih proteina uzrokuje da mikrotubuli međusobno proklizavaju što generira sile u diobenom vretenu [3]. Interakcije mikrotubula i kinetohora te sile generirane putem motornih proteina ono su što vodi gibanje kromosoma u prometafazi i metafazi.

1.2.1 Mikrotubuli i kinetohore

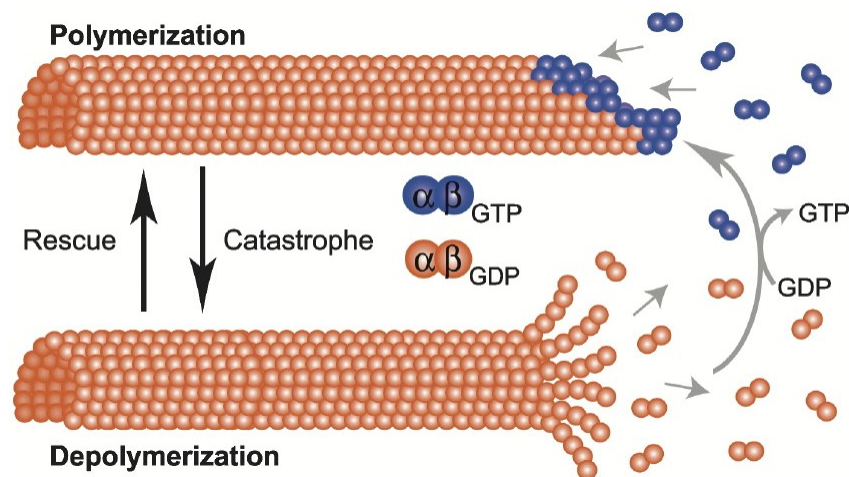
Mikrotubuli su šuplji, cilindrični polimeri sastavljeni od protofilamenata građenih od α i β -tubulin heterodimera [17, 50] (Slika 1.4).

Mikrotubuli su dinamički nestabilni. Mogu rasti u procesu zvanom polimerizacija te se skraćivati procesom depolimerizacije, a dinamička nestabilnost proizlazi iz činjenice da u bilo kojem trenutku mogu prijeći iz jednog procesa u drugi. Prijelaz iz rasta mikrotubula u skraćivanje se naziva katastrofa, a prijelaz iz skraćivanja u rast se naziva spašavanje (eng. *rescue*) [50] (Slika 1.5).

Dinamička svojstva mikrotubula, to jest polimerizacija, depolimerizacija i stohastički prijelazi između ta dva stanja, nužni su za formaciju diobenog vretena [65]. Mikrotubuli koji rastu

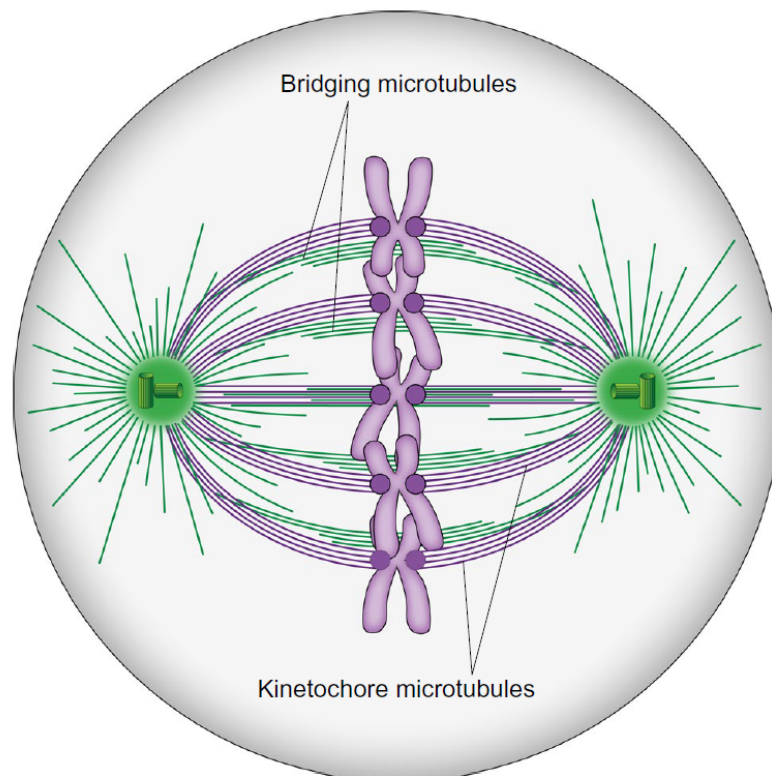


Slika 1.4: Generalna struktura mikrotubula. Slika je preuzeta iz [50].



Slika 1.5: Mikrotubuli se prebacuju između procesa polimerizacije i depolimerizacije. Slika je preuzeta iz [50].

s pola i vežu se na kromosome preko kinetohora nazivaju se kinetohorni mikrotubuli, a svežanj takvih mikrotubula čini kinetohorno vlakno [70, 81]. Mikrotubuli koji se ne vežu na kromosome nazivaju se nekinetohorni mikrotubuli. Nekinetohorni mikrotubuli se dijele na mikrotubule koji rastu prema rubu stanice (astralni mikrotubuli), mikrotubule koji rastu prema središtu diobenog vretena i imaju slobodne krajeve (polarni mikrotubuli) te mikrotubule koji rastu prema središtu diobenog vretena gdje formiraju antiparalelne preklope s mikrotubulima sa suprotnog pola (interpolarni mikrotubuli) [97] (Slika 1.6). Interpolarni mikrotubuli međusobno interagiraju, što omogućava motornim proteinima da ih kližu i međusobno povezuju (eng. *crosslink*) [9, 32, 41, 69, 77, 88]. Interpolarni mikrotubuli mogu povezivati kinetohorne mikrotubule vezane sa susjedne (sestrinske) kinetohore, u kojem se slučaju nazivaju prenosni mikrotubuli (eng. *bridging microtubules*), a svežanj takvih mikrotubula čini premosno vlakno (eng. *bridging fiber*) [43].

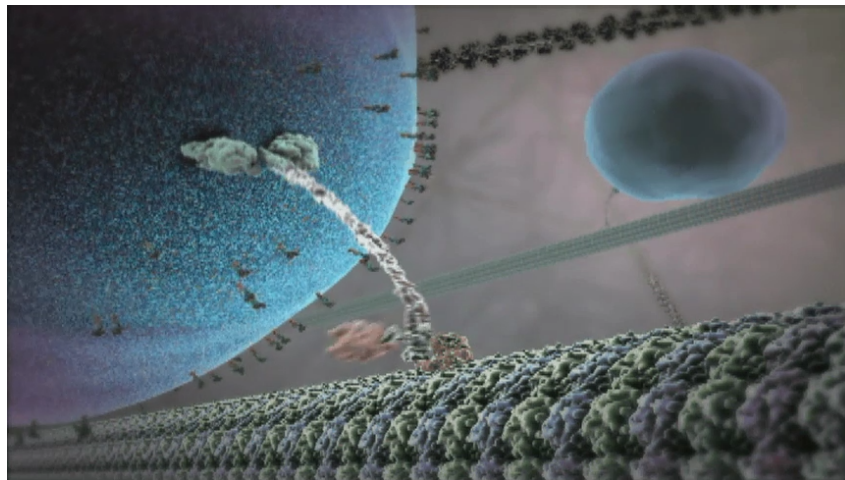


Slika 1.6: Shema diobenog vretena koja pokazuje kinetohorne (ljubičasto) i prenosne mikrotubule (zeleno). Slika je preuzeta iz [97].

1.2.2 Motorni proteini

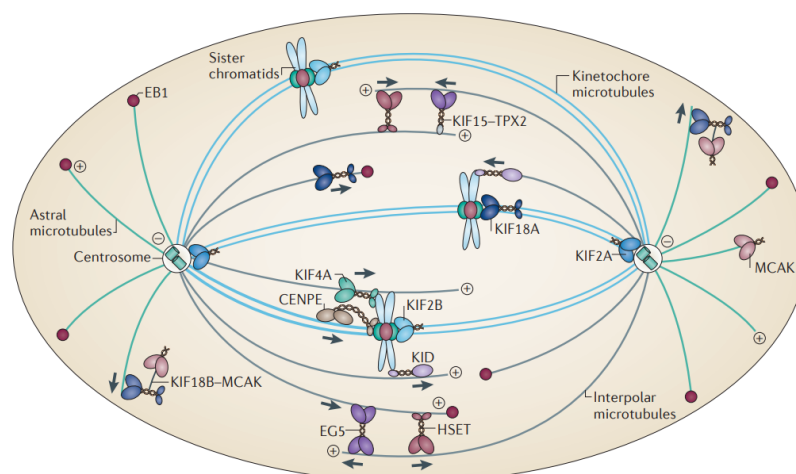
Motorni se proteini vežu na filamente citoskeleta i koriste energiju dobivenu hidrolizom ATP-a za gibanje po njima. Razlikuju se po vrsti filameta na kojeg se vežu (aktin ili mikrotubuli), smjeru gibanja i teretu kojeg nose. Glavna podjela motornih proteina je na tri grupe: miozini, dineini i kinezini. Miozini su jedina grupa koja se veže na aktin. Glavna razlika između proteina vezanih na mikrotubule jest u smjeru njihovog gibanja, to jest gibaju li se prema minus ili plus kraju mikrotubula. Minus kraj mikrotubula jest onaj koji sporije raste, a dineini se gibaju u smjeru tog kraja. Plus kraj mikrotubla jest onaj koji brže raste te se mikrotubul obično produžuje u tom smjeru. Kinezini su motorni proteini koji se gibaju u tom smjeru te često imaju mjesto vezanja za neku organelu ili drugi mikrotubul (Slika 1.7). Mnoge vrste kinezina imaju ulogu u formaciji diobenog vretena i razdvajanju kromosoma tijekom mitoze i mejoze [3].

Uloge kinezina u procesu mitoze su brojne. Pokazano je da KIF2A pomaže depolimerizaciju mikrotubula na minus kraju i nužan je za formaciju diobenog vretena. KIF2B promovira mitozu i vezan je za dinamike mikrotubula i kinetohora. MCAK je motorni protein koji sud-



Slika 1.7: Prikaz gibanja motornog proteina kinezina. Slika je preuzeta iz [106].

jeluje u depolimerizaciji na plus kraju mikrotubula i nužan je za kongresiju i poravnanje kromosoma. KIF4A i KIF4B sudjeluju u kondenzaciji kromosoma, formaciji središnje zone diobenog vretena u anafazi i citokinezi. CENP-E sudjeluje u procesu vezanja mikrotubula na kinetohore i signaliziranju prijelaza između faza mitoze. EG5 je odgovoran za razdvajanje dupliciranih centrosoma pri formaciji diobenog vretena. KIF14, KIF18A i KID su potrebni za kongresiju i poravnanje kromosoma, KIF15 za održavanje bipolarnosti diobenog vretena, a KIF18B za regulaciju dinamika mikrotubula. MKLP1, MKLP2 i MPP1 su nužni za proces citokineze. Na posljetku, HSET je potreban za formaciju diobenog vretena i citokinezu (Slika 1.8). Poremećaji u ulogama ili koncentracijama bilo kojeg od ovih kinezina povezani su s razvojem raznih vrsta rakova [79].



Slika 1.8: Pojednostavljen prikaz uloga različitih kinezina tijekom mitoze. Slika je preuzeta iz [79].

Poglavlje 2

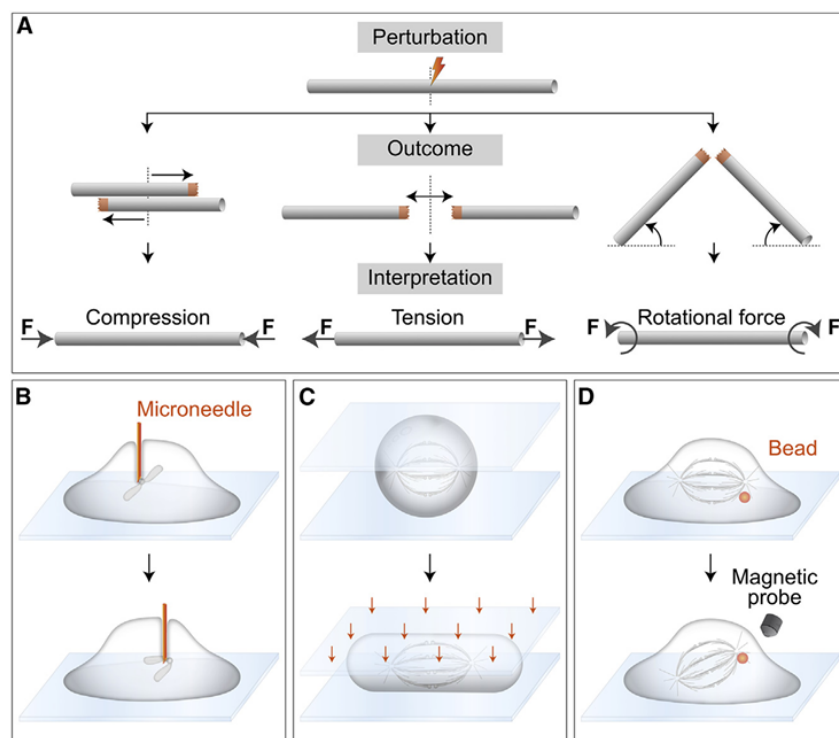
Fizikalni mehanizmi u diobenom vretenu

Sile orijentirane prema ekvatoru diobenog vretena nužne su za pozicioniranje kromosoma i time za pravilan tok mitoze te su razni modeli predloženi za opis izvora tih sila [22, 57]. Prijašnji eksperimenti pokazuju da mikrotubuli na polu djeluju silama koje guraju kromosome dalje od polova te se takve sile nazivaju silama izbacivanja s pola (eng. *polar ejection forces*) [5, 6, 68, 82, 83]. Uloge ovih sila u pozicioniranju kromosoma istražene su u teoretskim studijama, gdje te sile imaju učinak centriranja kromosoma jer se smanjuju kako se oni udaljavaju od pola [4, 12, 13, 42, 44]. Sile usmjerene prema ekvatoru diobenog vretena mogu biti i posljedica kinetohornih motornih proteina koji se gibaju po nekinetohornim mikrotubulima prema plus krajevima, kao što je CENP-E [7]. Također, kinetohorni mikrotubuli mogu djelovati vučnim silama na kinetohore putem depolimerizacije na plus krajevima [16, 31, 38, 52]. Vučne sile ovise o dužini mikrotubula zbog motornih proteina poput kinezina-8, koji "mjere" duljinu mikrotubula gibanjem do njihovog plus kraja gdje promoviraju depolimerizaciju te time povećavaju vučne sile na kinetohore, što uzrokuje centrirajući efekt [25, 61, 93, 101, 105]. Teorijske studije su pokazale takav efekt uzrokovan katastrofom mikrotubula ovisnom o dužini kod stanica kvasca [26, 28, 49, 59]. Svi ovi mehanizmi istovremeno doprinose pozicioniranju kromosoma u diobenom vretenu. U ovom poglavlju dan je pregled tih mehanizama kako bi se stekao uvid u mehanobiologiju diobenog vretena.

2.1 Proučavanje i modeliranje mehanobiologije diobenog vretena

Proučavanje djelovanja diobenog vretena provodi se pristupima baziranim na mehaničkim perturbacijama [75]. Jedna od najučinkovitijih metoda jest laserska ablacija koja omogućuje rezanje

snopa mikrotubula i direktnu identifikaciju smjera sila na osnovu gibanja dijelova mikrotubula (Slika 2.1A). Ako se dijelovi mikrotubula gibaju jedan prema drugom, mikrotubul je prije rezanja bio pod kompresijom (Slika 2.1A lijevo), ako se gibaju jedan od drugog mikrotubul je bio napet (Slika 2.1A sredina), a ako se rotiraju bio je pod utjecajem rotacijske sile (Slika 2.1A desno). Gibanje dijelova mikrotubula također može biti i kompleksno kao kombinacija translacijskog i rotacijskog gibanja. Ova je metoda korištena za proučavanje sila na kinetohore, počevši od istraživanja u kojem je ablacijom jedne kinetohore pokazana napetost između para sestrinskih kinetohora [63]. Nakon toga, laserska ablacija korištena je u brojnim istraživanjima mehanika mikrotubula, kinetohora i centrosoma [1, 14, 18, 21, 43, 45, 46, 58, 90, 91, 102].



Slika 2.1: Eksperimentalne metode proučavanja mehanobiologije diobenog vretena. (A) Lasersko rezanje (oznaka munje) mikrotubula (siva cijev) koristi se kao perturbacija koja može rezultirati trima različitim ishodima s odgovarajućim interpretacijama sila koje djeluju na mikrotubul. Narančasta boja označava krajeve mikrotubula dobivene laserskim rezanjem. (B) Vršak mikroigle (narančasto) dodiruje kromosom i pomiče ga udesno. (C) Stanica se stisne pod pokrovnim stakalcem kada se primijeni kompresijska sila (narančaste strelice). (D) Magnetska kuglica (narančasto) pomiče diobeno vreteno kada je primijenjena magnetska sila. Slika je preuzeta iz [75].

Laserskom ablacijom perturbiraju se postojeće sile u diobenog vretenu. Međutim, druge metode primjenjuju vanjske sile na diobeno vreteno. Jedan primjer je korištenje mikroigle kako bi se rastegnuli, pomicali ili zaustavili kromosomi i time se mjerile sile koje djeluju na njih [71,

72] (Slika 2.1B). Vanjske sile primijenjene mikroiglom ili stiskanjem čitave stanice korištene su za promjenu sila u diobenom vretenu i time proučavanje mehaničkih svojstava diobenog vretena [20, 39, 94] (Slika 2.1C). Za pomicanje diobenog vretena mogu se koristiti optičke i magnetske pincete, što daje uvid u sile kojima se pozicionira diobeno vreteno [27, 98] (Slika 2.1D).

Navedene metode kombiniraju se sa svjetlosnom mikroskopijom, koja omogućuje promatranje ishoda eksperimenta. Fluorescentno označavanje proteina koristi se za proučavanje arhitekture diobenog vretena, to jest položaja određenih proteina prije i poslije perturbacija [86].

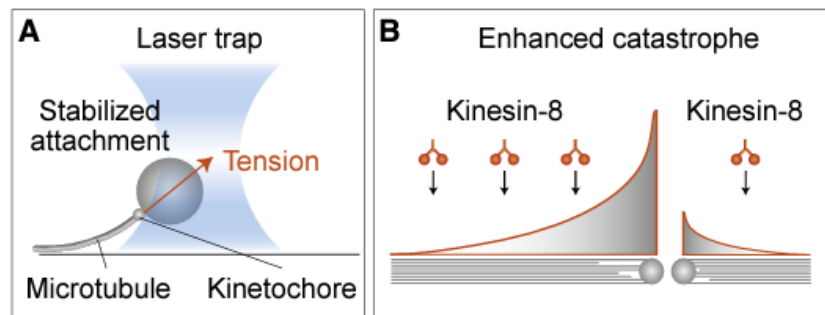
Kako bi se došlo do novih otkrića u dinamici diobenog vretena potrebno je predlagati hipoteze o funkcijama komponenti diobenog vretena. Teorijski modeli korisni su za tu svrhu jer se hipoteze predložene njima mogu riješiti i usporediti s eksperimentalnim rezultatima te time identificirati glavne koncepte funkcioniranja diobenog vretena.

2.2 Dinamika mikrotubula u diobenom vretenu

Sile u diobenom vretenu povezane su s brzinama te mogu ubrzati ili usporiti kemijske reakcije. Brzina polimerizacije mikrotubula ovisi o razlici dodavanja i otklanjanja pojedinih mikrotubula te kompresijska sila koja se pojavljuje kada vrh mikrotubula naiđe na prepreku može uzrokovati smanjenje stope dodavanja pojedinih te time usporenje polimerizacije [19]. Depolimerizacija mikrotubula može generirati silu koja pomiče teret, na primjer kinetohoru, na plus kraju mikrotubula, a sila koja djeluje na plus kraj mikrotubula može promijeniti dinamiku mikrotubula i stopu odvajanja tereta [2, 31, 55]. Sila napetosti primijenjena na kinetohore stabilizira vezu između kinetohore i depolimerizirajućih mikrotubula i utječe na brzine rasta i skraćivanja mikrotubula [2] (Slika 2.2A).

Jedan od ključnih mehanizama u diobenom vretenu zasniva se na akumulaciji motornih proteina ovisnoj o duljini mikrotubula na kraju mikrotubula gdje onda reguliraju njihovu dinamiku (Slika 2.2B). Motorni proteini vežu se duž cijelog mikrotubula i stoga dulji mikrotubuli akumuliraju veći broj motornih proteina. Ti se motorni proteini zatim gibaju do plus kraja mikrotubula, gdje induciraju katastrofu mikrotubula i time im ograničavaju duljinu [96, 100, 101]. Ovaj mehanizam potpomaže i u pozicioniranju kromosoma na središtu diobenog vretena [49, 93].

Duljinu antiparalelnog preklopa mikrotubula također reguliraju motorni proteini koje na preklap ovisno u njegovoj duljini akumuliraju proteini koji vezuju jedan mikrotubul za drugi [9]. Za takve proteine će se radi jednostavnosti u ostatku teksta koristiti engleski naziv *crosslinker*. *Crosslinkeri* sprječavaju potpuno klizanje mikrotubula i time stabiliziraju preklap entropijskim silama generiranim difuzijom *crosslinkera* [10, 53]. Motorni proteini u preklopu generiraju sile



Slika 2.2: Dinamika mikrotubula. (A) Utjecaj sile na dinamiku mikrotubula može se proučavati optičkim pincetama. Sila laserske klopke primjenjuje se na vršak mikrotubula te rezultira stabiliziranjem veze između mikrotubula i kinetohore. (B) Motorni proteini kinezin-8 (narančasto) vežu se duž mikrotubula i akumuliraju na vrhu, gdje pojačavaju proces katastrofe. Dulji mikrotubuli akumuliraju veći broj motornih proteina. Slika je preuzeta iz [75].

ovisne o duljini preklopa koje međusobno kližu mikrotubule [89].

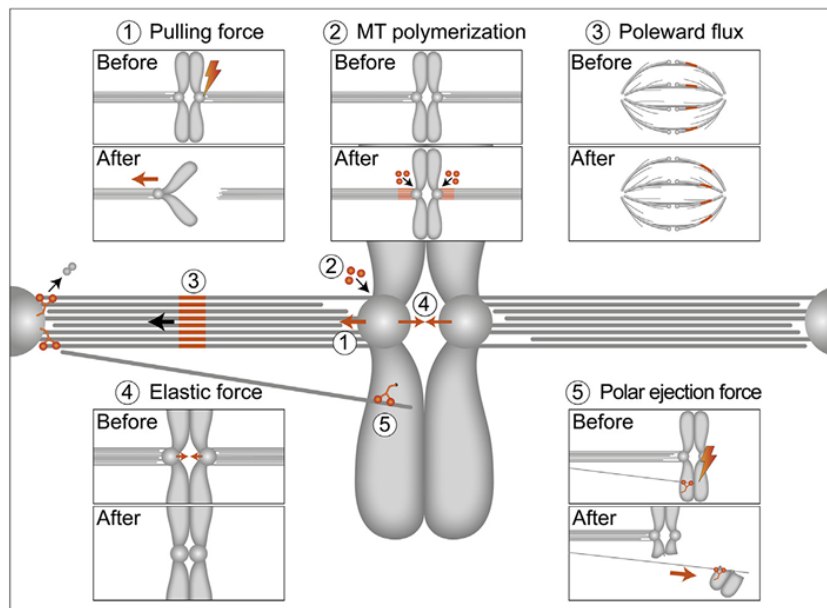
2.3 Sile na kromosome u metafazi

Metafaza je najviše proučavana faza mitoze zbog stabilnosti diobenog vretena u toj fazi, što olakšava promatranje rezultata perturbacija. Glavni cilj proučavanja metafaze je identifikacija sila koje djeluju na kromosome kako bi ih centrirale i zadržale u blizini ekvatora diobenog vretena. Laserska ablacija kinetohora pokazala je da kinetohorni mikrotubuli vezani plus krajevima na kinetohore djeluju vučnim silama na njih usmjerenim prema polu [63] (Slika 2.3, točka 1). Mikrotubuli se također polimeriziraju na kinetohorima [64] (Slika 2.3, točka 2).

Vučnim silama na kinetohore suprotstavljaju se elastične sile kromatina, što se može uočiti činjenicom da su biorijentirane kinetohore udaljenije od onih bez prikvačenih mikrotubula [78, 103] (Slika 2.3, točka 4). Na kromatin djeluju i mikrotubuli koji rastu s pola silama izbacivanja s pola te odguruju krakove kromosoma, što se prenosi na kinetohore [82] (Slika 2.3, točka 5).

Mehanobiološki eksperimenti doveli su do slike gibanja kromosoma u diobenom vretenu koje vode vučne sile kinetohornih mikrotubula i sile izbacivanja s pola nekinetohornih mikrotubula [83]. Kako bi se istražili ti procesi, uvedeni su brojni teorijski modeli [12, 13, 42, 46]. Međutim, ti modeli ne daju potpunu sliku sila u diobenom vretenu tijekom metafaze.

Kinetohorni mikrotubuli kontinuirano se premještaju prema polu, što se može vidjeti kao gibanje usmjereno prema polu fotoaktiviranih segmenata mikrotubula [67] (Slika 2.3, točka 3). Ovo gibanje zajedno s konstantnom duljinom diobenog vretena dovodi do zaključka da su kinetohorni mikrotubuli istovremeno polimeriziraju na kinetohorima, a depolimeriziraju na



Slika 2.3: Pojednostavljen prikaz sila koje djeluju na kromosome u diobenom vretenu. Mikrotubuli (sive linije) protežu se od polova diobenog vretena (sivi polukrugovi) do kinetohora (sivi krugovi) i kromosoma, a motorni proteini (narančasto) vežu se na polove i kromosome i međudjeluju s mikrotubulima. (1) Lasersko rezanje (munja) desne kinetohore uzrokuje gibanje lijeve kinetohore ulijevo. (2) Integracija tubulina (narančasto) na vrhove mikrotubula pokazuje polimerizaciju mikrotubula na kinetohorima. (3) Segmenti mikrotubula (narančasto) gibaju se prema polu diobenog vretena. (4) Elastična sila (narančasto) približava kinetohore kada se uklone vučne sile mikrotubula. (5) Lasersko rezanje (munja) dijela kromosoma uzrokuje udaljavanje od pola zbog sila kojima djeluju motorni proteini (narančasto). Slika je preuzeta iz [75].

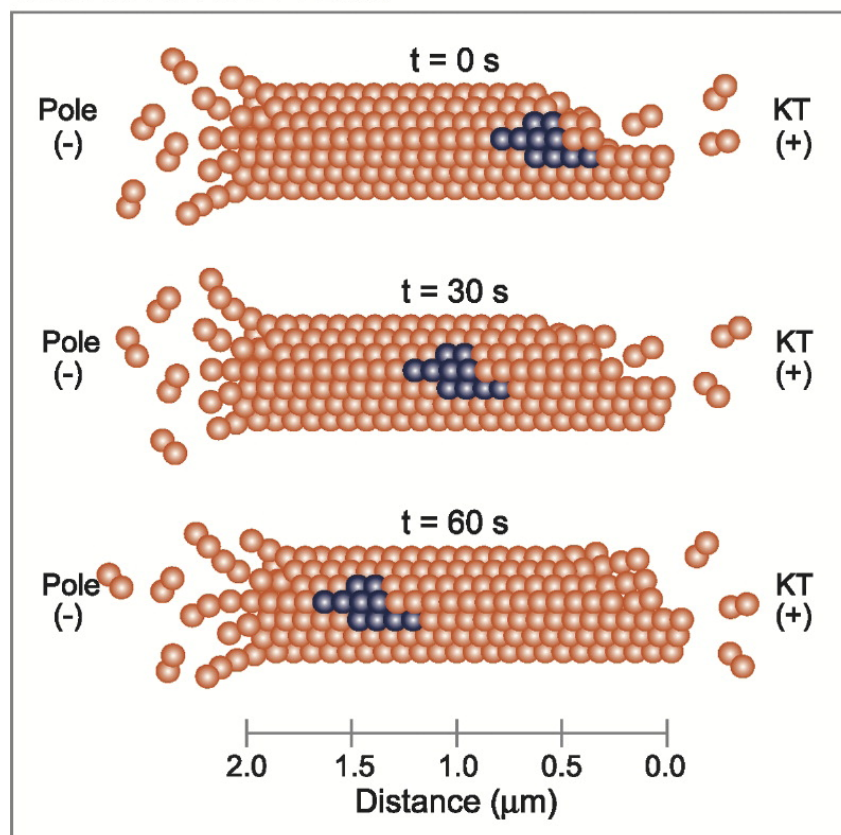
polovima diobenog vretena. Taj proces nazivamo tok mikrotubula usmjeren prema polu (eng. *poleward flux*).

2.4 Tok mikrotubula usmjeren prema polu

Kinetohorna vlakna pod utjecajem su sila koje vode njihov tok usmjeren prema polu [23, 33, 35, 67] (Slika 2.4). Zbog jednostavnosti, u ostatku teksta će se za tok mikrotubula usmjeren prema polu koristiti engleski naziv *poleward flux*. *Poleward flux* je gibanje kinetohornog vlakna kod kojeg se čitavo vlakno premješta prema polu poput pokretne trake dok se minus krajevi depolimeriziraju i plus krajevi polimeriziraju. Višestruki motorni proteini vode i reguliraju ovaj proces [24, 36, 85, 92]. Snimanje diobenih vretena električnim mikroskopom je dovelo do ideje da je ono što pokreće *poleward flux* motornim proteinima pogonjeno klizanje kinetohornih vlakana u odnosu na interpolarna vlakna, to jest premosna vlakna [43, 66, 74]. Pokazano

je i da kinezin-5 doprinosi *poleward fluxu* kinetohornih i interpolarnih mikrotubula kod mitoze embrija *Drosophila* voćnih mušica [11]. Prijašnji teorijski modeli pokazuju da *poleward flux* interpolarnih mikrotubula koji se prenosi na kinetohorne mikrotubule utječe na sile na kinetohorama te promovira ujednačenost napetosti na njima, što je i u slaganju s eksperimentima koji pokazuju varijacije u napetosti na kinetohorama kod stanica s ukinutim tokom [60]. Ovo uparivanje između kinetohornih vlakana i pridruženih interpolarnih vlakana, to jest prenosnih vlakana, važno je ne samo za održavanje napetosti na kinetohorama, već i za poravnavanje kromosoma. Eksperimentalno je pokazano da optogenetičke perturbacije na prenosnim vlaknima uzrokuju pogrešno poravnanje kromosoma popraćeno izduženjem preklopa u prenosnim vlaknima [40]. Ta otkrića, zajedno s idejom da se *poleward flux* generira na prenosnim vlaknima i zatim prenosi na kinetohorna vlakna, dovode do zaključka da su poravnanje kromosoma, preklopi prenosnih vlakana i *poleward flux* možda međusobno povezani. Iz tog je razloga razvijen model centriranja kromosoma u metafazi putem *poleward fluxa* koji se predstavlja u ovoj disertaciji [84]. Proširenje tog modela kasnije se primjenjuje i na kongresiju kromosoma tijekom prometofaze.

MICROTUBULE FLUX



Slika 2.4: Shema toka mikrotubula prema polu. Slika je preuzeta iz [50].

Poglavlje 3

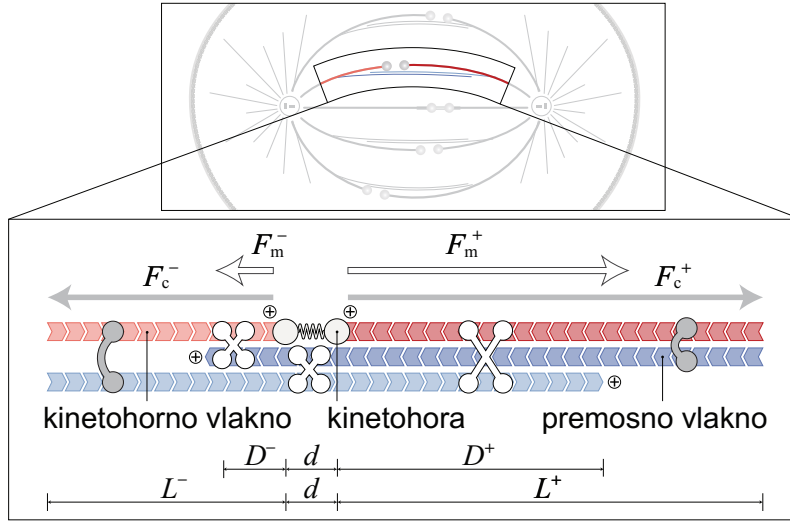
Model za centriranje kromosoma u metafazi

Kako bi se istražila ideja da *poleward flux* pomaže pri centriranju kromosoma, uvodi se model centriranja vođenog *poleward fluxom*, gdje kinetohorna vlakna lateralno međudjeluju s premosnim vlaknima (Slika 3.1). Centralna ideja ove teorije jest da kinetohore, a time i kromosome, centriraju vučne sile proporcionalne preklopima između kinetohornih i premosnih vlakana, generirane aktivnostima motornih proteina i pasivnih *crosslinkera*. Kada se kinetohore izmaknu iz centra diobenog vretena, razlika u duljini sestrinskih kinetohornih vlakana uzrokuje i razliku u duljini antiparalelnih preklopa s lijeve i desne strane kinetohora. Posljedica toga je razlika u broju nakupljenih motornih proteina s obje strane, što dovodi do generiranja centrirajuće sile na kinetohore. Analogno tome, razlike u duljini paralelnih preklopa i broju pasivnih *crosslinkera* također dovode do centriranja kinetohora. Stoga, kinetohore se u ovom modelu centriraju preko ravnoteže sila na sestrinskim kinetohornim vlaknima, što je različito od prethodnih modela zasnovanih na dinamici plus krajeva kinetohornih vlakana i silama izbacivanja s pola.

3.1 Sile u modelu

Jedinstvena značajka ovog fizikalnog modela jest to što se motorni proteini nakupljaju u antiparalelnim preklopima između kinetohornih i premosnih vlakana, gdje klizanjem razdvajaju mikrotubule. Te sile klizanja,

$$F_m^\pm = D^\pm n_m f_m^\pm, \quad (3.1)$$



Slika 3.1: Shema diobenog vretena (gore) i shema modela (dolje). Kinetohorni mikrotubuli (crveno) idu od rubova do elastično povezanih kinetohora (krugovi povezani oprugom), a premosni mikrotubuli (plavo) od rubova jedan prema drugom. Motori proteini (bijeli X-evi) djeluju silama, F_m^\pm , između antiparalelnih mikrotubula, a pasivni *crosslinkeri* (sivi C-ovi) djeluju silama, F_c^\pm , između paralelnih mikrotubula. Eksponenti + i - označavaju desnu, odnosno lijevu stranu modela. Slika je adaptirana iz [84].

proporcionalne su duljini antiparalelnih preklopa, D^\pm , prema *in vitro* eksperimentima [89]. Sile su također proporcionalne linearnoj gustoći motora, n_m , i sili koju pojedini motori proizvode, f_m^\pm . Eksponenti + i - označavaju desnu, odnosno lijevu stranu modela u ovim i svim budućim izrazima.

Paralelni preklopi između kinetohornih i premosnih vlakana povezani su pasivnim *crosslinkerima* koji prenose sile klizanja s premosnih na kinetohorna vlakna. Analogno silama motornih proteina, sile kojima djeluju pasivni *crosslinkeri*,

$$F_c^\pm = L^\pm n_c f_c^\pm, \quad (3.2)$$

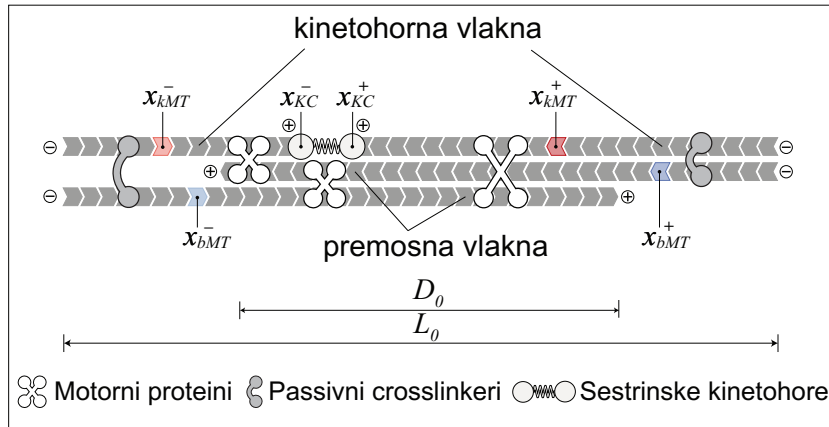
proporcionalne su duljini paralelnih preklopa, L^\pm , linearnoj gustoći pasivnih *crosslinkera*, n_c , i sili koju pojedini *crosslinkeri* proizvode, f_c^\pm .

Silama koje generiraju motorni proteini na kinetohorno vlakno suprotstavljaju se sile koje djeluju na kinetohore, F_{KC}^\pm , i sile pasivnih *crosslinkera*,

$$F_m^\pm = F_{KC}^\pm + F_c^\pm. \quad (3.3)$$

Ovo su glavne jednadžbe modela te se koristeći njih zajedno sa silama na prenosnim vlaknima, vezama između sila i brzina pojedinih motora te silama trenja kojima djeluju kinetohore i pasivni *crosslinkeri* mogu izračunati brzine kinetohornih vlakana, a time i brzine kinetohora.

Model opisuje sustav s dvije sestrinske kinetohore. Kinetohorna vlakna predstavljena su dvama mikrotubulima, jednim s desne i jednim s lijeve strane kinetohora, koji se protežu od rubova diobenog vretena do kinetohora. Slično tome, prenosna vlakna predstavljena su dvama mikrotubulima koji se protežu od rubova i međusobno interagiraju u sredini diobenog vretena (Slike 3.1 i 3.2). Položaji sestrinskih kinetohora označeni su s x_{KC}^{\pm} , a položaji kinetohornih i prenosnih vlakana uzeti su kao proizvoljne točke duž njih i označeni s x_{kMT}^{\pm} , odnosno x_{bMT}^{\pm} . Eksponenti + i - označavaju desnu, odnosno lijevu stranu modela u ovim i svim budućim izrazima. Svi položaji se mijenjaju u vremenu t i brzine im se računaju kao $v_i^{\pm} = dx_i^{\pm}/dt$, za $i = KC, kMT, bMT$. Iako nije direktno opisana, brzina rasta kinetohornih vlakana računa se kao $v_{KC}^{\pm} - v_{kMT}^{\pm}$. Duljina preklopa mikrotubula u prenosnim vlaknima označena je D_0 , a duljina diobenog vretena označena je L_0 .



Slika 3.2: Shema modela. Kinetohorni mikrotubuli idu od rubova prema elastično povezanim kinetohorima, a prenosni mikrotubuli od rubova jedan prema drugom. Motori proteini povezuju antiparalelne mikrotubule, a pasivni *crosslinkeri* paralelne. Ukupne duljine antiparalelnog i paralelnog preklopa mikrotubula označene su s D_0 , odnosno L_0 . Položaji sestrinskih kinetohora označeni su na x-osi. Položaji kinetohornih (crveno) i prenosnih vlakana (plavo) uzeti su kao proizvoljne točke duž njih i također su označeni na x-osi. Eksponenti + i - označavaju desnu, odnosno lijevu stranu modela. Legenda na dnu opisuje simbole za različite elemente diobenog vretena u shemi. Slika je adaptirana iz [84].

Kako bi se izračunalo gibanje kinetohora potrebno je prvo opisati sile koje djeluju na njih. Elastična veza između sestrinskih kinetohora opisana je silom opruge dane po Hookeovom zakonu,

$$F_{el} = k(x_{KC}^+ - x_{KC}^- - x_0), \quad (3.4)$$

gdje k označava elastični koeficijent, a x_0 duljinu opruge u mirovanju. Kinetohore također međudjeluju s mikrotubulima i sila kojom plus krajevi mikrotubula djeluju na kinetohore opisana je kao

$$F_{\text{KC}}^{\pm} = -\mu_{\text{KC}}(v_{\text{KC}}^{\pm} - v_{\text{kMT}}^{\pm}), \quad (3.5)$$

gdje μ_{KC} označava koeficijent efektivnog trenja na kinetohori. Ovaj opis sile na kinetohorama je pojednostavljenje veze između brzine i sile koja je prijašnje izmjerena za kinetohore [2]. Ove dvije sile jedine su sile koje djeluju na kinetohore u ovom modelu te su međusobno u ravnoteži,

$$F_{\text{KC}}^{\pm} = \pm F_{\text{el}}. \quad (3.6)$$

Ove jednadžba također uključuje i ravnotežu sila između sestrinskih kinetohora,

$$F_{\text{KC}}^{+} = -F_{\text{KC}}^{-}. \quad (3.7)$$

Gibanje kinetohornog vlakna vođeno je silama kojima djeluju molekularni motori raspoređeni duž preklopa između kinetohornih i premosnih vlakana, F_{m}^{\pm} . Ovim silama suprotstavljaju se sile prigušivanja kojima djeluju *crosslinker* proteini, F_{c}^{\pm} , i sile na kinetohorama,

$$F_{\text{m}}^{\pm} - F_{\text{c}}^{\pm} - F_{\text{KC}}^{\pm} = 0. \quad (3.8)$$

Ovaj izraz proizlazi iz jednadžbe 3.3.

Sile motora raspoređenih duž antiparalelnog preklopa kinetohornih i premosnih vlakana opisane su jednadžbom 3.1. Sila kojom djeluje jedan motor ovisi o relativnoj brzini kinetohornog i premosnog vlakna sa suprotnih strana kinetohora i opisana je linearnom relacijom između sile i brzine,

$$v_{\text{kMT}}^{\pm} - v_{\text{bMT}}^{\mp} = v_0(\pm 1 - f_{\text{m}}^{\pm}/f_0), \quad (3.9)$$

gdje f_0 označava maksimalnu silu motornih proteina, a v_0 brzinu motornih proteina bez tereta. Broj motornih proteina dan je kao

$$N_{\text{m}}^{\pm} = n_{\text{m}}D^{\pm}, \quad (3.10)$$

gdje je n_{m} oznaka za linearnu gustoću motornih proteina, a D^{\pm} duljina antiparalelnog preklopa između kinetohornih i premosnih vlakana, dana kao $D^{\pm} = (D_0/2 \mp x_{\text{KC}}^{\pm})\theta(D_0/2 \mp x_{\text{KC}}^{\pm})$, gdje je θ Heavisideova step funkcija koja osigurava da antiparalelni preklop postoji.

Sile prigušivanja *crosslinker* proteina dane su jednadžbom 3.2, gdje je sila prigušivanja jednog *crosslinkera* dana kao

$$f_{\text{c}}^{\pm} = \mu_{\text{c}}(v_{\text{kMT}}^{\pm} - v_{\text{bMT}}^{\pm}), \quad (3.11)$$

gdje je μ_c koeficijent trenja *crosslinkera*, a $v_{\text{KMT}}^{\pm} - v_{\text{bMT}}^{\pm}$ relativna brzina kinetohornog i premosnog vlakna. Broj pasivnih *crosslinkera* raspoređenih po paralelnom preklopu kinetohornih i premosnih vlakana dan je kao

$$N_c^{\pm} = n_c L^{\pm}, \quad (3.12)$$

gdje je n_c oznaka za linearnu gustoću pasivnih *crosslinkera*, a L^{\pm} duljina kinetohornog vlakna, definirana kao $L^{\pm} = \pm(L_0/2 - x_{\text{KC}}^{\pm})$.

Gibanje premosnog vlakna vođeno je silom kojom djeluju motori raspoređeni po antiparalelnom preklopu između premosnih vlakana, F_{bMT} . Ovoj se sili suprotstavljaju sile motornih proteina koje djeluju duž antiparalelnog preklopa između kinetohornih i premosnih vlakana te sile prigušenja *crosslinker* proteina duž paralelnog preklopa između kinetohornih i premosnih vlakana,

$$F_{\text{bMT}} \pm F_m^{\mp} \pm F_c^{\pm} = 0. \quad (3.13)$$

Sila koja djeluje u preklopu premosnih vlakana ovisi o broju motornih proteina u tom preklopu,

$$N_{\text{bMT}} = n_m D_0, \quad (3.14)$$

te o relativnim brzinama premosnih vlakana,

$$F_{\text{bMT}} = N_{\text{bMT}} f_0 [1 - (v_{\text{bMT}}^+ - v_{\text{bMT}}^-)/v_0]. \quad (3.15)$$

3.2 Aproksimacije korištene pri rješavanju modela

Iako se model može riješiti bez aproksimacija, i takvo je rješenje dano u potpoglavlju 3.7, uvode se dvije aproksimacije koje vrijede za prijašnje proučavana diobena vretena, a pojednostavljuju izračun modela bez velikih odstupanja u rješenju.

Prvo, zanemarujemo razlike u brzinama kinetohora,

$$\Delta v_{\text{KC}} \equiv v_{\text{KC}}^+ - v_{\text{KC}}^- = 0, \quad (3.16)$$

što je moguće učiniti zahvaljujući sljedećim argumentima. Interkinetohorna brzina na vremenskim skalama relevantnim za centriranje kinetohora, $t_c = D_0/(v_{\text{KC}}^+ + v_{\text{KC}}^-)$, ima približnu vrijednost $\Delta v_{\text{KC}} \approx (x_{\text{KC}}^+ - x_{\text{KC}}^-)/t_c$. Primjenom jednadžbe 3.6, normalizirana interkinetohorna brzina ima oblik

$$\frac{\Delta v_{\text{KC}}}{v_{\text{KC}}^+ + v_{\text{KC}}^-} = \left[\frac{2kD_0}{\mu_{\text{KC}}v_0} + \frac{v_{\text{KC}}^+ + v_{\text{KC}}^-}{v_0} \right]^{-1}, \quad (3.17)$$

gdje se koristi $v_0 = v_{\text{kMT}}^+ - v_{\text{kMT}}^-$ kao gornja granica za razliku u brzini kinetohornih vlakana. U slučaju parametara relevantnih za ovaj sustav, to jest konstanta opruge koje predstavlja elastičnost kromosoma $k = 100 \text{ pN}/\mu\text{m}$ ([42]) te D_0 , μ_{KC} i v_0 dani kao što je pojašnjeno u potpoglavlju 3.4, prvi član na desnoj strani jednadžbe 3.17 poštuje

$$\frac{2kD_0}{\mu_{\text{KC}}v_0} \gg 1. \quad (3.18)$$

U ovoj granici desna strana jednadžbe 3.17 približava se nuli i interkinetohorna brzina može biti zanemarena.

Drugo, brzine premosnih vlakana se postavljaju na vrijednost $v_{\text{bMT}}^\pm = \pm v_0/2$. Za kinetohore koje se nalaze u centralnom položaju na diobenom vretenu regije preklopa s lijeve i desne strane imaju iste duljine, $D^+ = D^-$ i $L^+ = L^-$. Primjenom ove simetrije na jednadžbe 3.13, dobiva se izraz

$$\frac{2v_{\text{bMT}}^+}{v_0} \left(1 + \frac{N_c^+ \mu_c}{N_{\text{bMT}} f_0} \frac{v_0}{2} + \frac{D^+}{2D_0} \right) = 1 + \frac{N_c^+ \mu_c}{N_{\text{bMT}} f_0} v_{\text{kMT}}^+ - \frac{D^+}{D_0} \left(-1 - \frac{v_{\text{kMT}}^-}{v_0} \right). \quad (3.19)$$

U slučaju u kojem doprinosi motora dominiraju nad doprinosima *crosslinkera*, $N_c^+ \mu_c v_0 \ll 2N_{\text{bMT}} f_0$, drugi član u zagradi s lijeve strane jednadžbe mnogo je manji od 1. Analogno tome, drugi član na desnoj strani može biti zanemaren. Zato što je duljina antiparalelnog preklopa između kinetohornih i premosnih vlakana mnogo manja od duljine preklopa između premosnih vlakana, $D^+ \ll D_0$, treći član na obje strane jednadžbe može se zanemariti. U tim granicama, jednadžba 3.19 reducira se na $2v_{\text{bMT}}^+/v_0 = 1$. U potpoglavlju 3.8 izračunat je tok premosnih vlakana za parametre kao u potpoglavlju 3.4. Podatci iz tog računa otkrivaju da su relativne devijacija toka bez aproksimacija od $v_0/2$ dok se mijenja tijekom centriranja kinetohora između 5.5% i 12%. Nadalje, za dulji preklap premosnih vlakana, $D_0 = 8\mu\text{m}$, devijacije su između 7.5% i 10%.

3.3 Računanje brzina kinetohornih vlakana i kinetohora

Primjenom aproksimacija danih u potpoglavlju 3.2, relacije između sile i brzine za pojedine motore te sila trenja za pasivne *crosslinkere* i kinetohore na jednadžbe 3.8 mogu se izvesti izrazi za brzine kinetohornih vlakana, a time i izraz za brzinu centriranja para sestrijskih kinetohora.

Primjenom jednadžbe 3.8 na jednadžbu 3.7, dobije se sljedeći izraz:

$$F_c^+ - F_m^+ = -F_c^- + F_m^-. \quad (3.20)$$

Upotrebom jednadžbi 3.1, 3.2, 3.9, 3.10, 3.11 i 3.12, ovaj se izraz može raspisati kao

$$\begin{aligned} N_c^+ \mu_c \left(v_{\text{kMT}}^+ - \frac{v_0}{2} \right) - N_m^+ f_0 \left(1 - \frac{v_{\text{kMT}}^+}{v_0} - \frac{v_0/2}{v_0} \right) = \\ = -N_c^- \mu_c \left(v_{\text{kMT}}^- + \frac{v_0}{2} \right) + N_m^- f_0 \left(-1 - \frac{v_{\text{kMT}}^-}{v_0} + \frac{v_0/2}{v_0} \right). \end{aligned} \quad (3.21)$$

Nadalje, primjenom jednadžbi 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 te 3.5 na jednadžbu 3.8 za desnu stranu,

$$F_c^+ - F_m^+ = -F_{\text{KC}}^+, \quad (3.22)$$

dobiva se sljedeći izraz:

$$N_c^+ \mu_c \left(v_{\text{kMT}}^+ - \frac{v_0}{2} \right) - N_m^+ f_0 \left(1 - \frac{v_{\text{kMT}}^+}{v_0} - \frac{v_0/2}{v_0} \right) = \mu_{\text{KC}} (v_{\text{KC}} - v_{\text{kMT}}^+). \quad (3.23)$$

Sortiranjem članova u ovom izrazu dobije se

$$v_{\text{kMT}}^+ \left(N_c^+ \mu_c + \frac{N_m^+ f_0}{v_0} + \mu_{\text{KC}} \right) = \mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} + \frac{v_0}{2} \left(N_c^+ \mu_c - \frac{N_m^+ f_0}{v_0} \right) + N_m^+ f_0. \quad (3.24)$$

Analogno ovome, za lijevu stranu jednadžbe 3.8,

$$F_c^- - F_m^- = -F_{\text{KC}}^-, \quad (3.25)$$

primjenom jednadžbi 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 i 3.5 dobiva se

$$N_c^- \mu_c \left(v_{\text{kMT}}^- + \frac{v_0}{2} \right) - N_m^- f_0 \left(-1 - \frac{v_{\text{kMT}}^-}{v_0} + \frac{v_0/2}{v_0} \right) = \mu_{\text{KC}} (v_{\text{KC}} - v_{\text{kMT}}^-), \quad (3.26)$$

što se zatim sortiranjem članova zapisuje kao

$$v_{\text{kMT}}^- \left(N_c^- \mu_c + \frac{N_m^- f_0}{v_0} + \mu_{\text{KC}} \right) = \mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} + \frac{v_0}{2} \left(-N_c^- \mu_c + \frac{N_m^- f_0}{v_0} \right) - N_m^- f_0. \quad (3.27)$$

U ovom dijelu izračuna uvode se tri pokrate kako bi se jednadžbe mogle lakše zapisati:

$$g_m^\pm \equiv \frac{N_m^\pm f_0}{v_0}, \quad (3.28)$$

$$g_c^\pm \equiv N_c^\pm \mu_c, \quad (3.29)$$

$$\alpha^{\pm} \equiv \frac{1}{N_c^{\pm} \mu_c + \frac{N_m^{\pm} f_0}{v_0} + \mu_{KC}}. \quad (3.30)$$

Upotrebom ovih pokrata te izraza 3.24 i 3.27, mogu se izvesti izrazi za brzine kinetohornih vlakana. Za desnu stranu taj izvod glasi:

$$\begin{aligned} v_{kMT}^+ &= \alpha^+ \left(\mu_{KC} v_{KC} + \frac{v_0}{2} (g_c^+ - g_m^+) + g_m^+ v_0 \right) = \\ &= \alpha^+ \left(\mu_{KC} v_{KC} + \frac{v_0}{2} (g_c^+ - g_m^+ + 2g_m^+) \right) = \\ &= \alpha^+ \left(\mu_{KC} v_{KC} + \frac{v_0}{2} (g_c^+ + g_m^+) \right). \end{aligned} \quad (3.31)$$

Analogno, izvod za lijevu stranu glasi:

$$\begin{aligned} v_{kMT}^- &= \alpha^- \left(\mu_{KC} v_{KC} + \frac{v_0}{2} (-g_c^- + g_m^-) - g_m^- v_0 \right) = \\ &= \alpha^- \left(\mu_{KC} v_{KC} + \frac{v_0}{2} (-g_c^- + g_m^- - 2g_m^-) \right) = \\ &= \alpha^- \left(\mu_{KC} v_{KC} - \frac{v_0}{2} (g_c^- + g_m^-) \right). \end{aligned} \quad (3.32)$$

Dakle, konačni izraz za brzinu kinetohornih vlakana za obje strane diobenog vretena glasi

$$v_{kMT}^{\pm} = \alpha^{\pm} \left(\mu_{KC} v_{KC} \pm \frac{v_0}{2} (g_c^{\pm} + g_m^{\pm}) \right). \quad (3.33)$$

Kako bi se izračunala brzina kinetohora, potrebno je prvo uvrstiti izraz za brzinu kinetohornih vlakana iz jednadžbe 3.33 u jednadžbu 3.21:

$$\begin{aligned} &g_c^+ \left(-\frac{v_0}{2} + \alpha^+ \mu_{KC} v_{KC} + \alpha^+ \frac{v_0}{2} (g_c^+ + g_m^+) \right) \\ &- g_m^+ \left(-\frac{v_0}{2} + v_0 - \alpha^+ \mu_{KC} v_{KC} - \alpha^+ \frac{v_0}{2} (g_c^+ + g_m^+) \right) = \\ &= -g_c^- \left(\frac{v_0}{2} + \alpha^- \mu_{KC} v_{KC} - \alpha^- \frac{v_0}{2} (g_c^- + g_m^-) \right) \\ &+ g_m^- \left(\frac{v_0}{2} - v_0 - \alpha^- \mu_{KC} v_{KC} - \alpha^- \frac{v_0}{2} (g_c^- + g_m^-) \right). \end{aligned} \quad (3.34)$$

Sljedeće se radi jednostavnosti sortiraju članovi koji množe brzinu kinetohora i oni koji ju ne množe:

$$\begin{aligned} &\mu_{KC} v_{KC} (\alpha^+ g_c^+ + \alpha^+ g_m^+ + \alpha^- g_c^- + \alpha^- g_m^-) = \\ &= \frac{v_0}{2} (g_c^+ + g_m^+ - \alpha^+ g_c^+ (g_c^+ + g_m^+) - \alpha^+ g_m^+ (g_c^+ + g_m^+) \\ &- g_c^- - g_m^- + \alpha^- g_c^- (g_c^- + g_m^-) + \alpha^- g_m^- (g_c^- + g_m^-)). \end{aligned} \quad (3.35)$$

Sada se u ovom izrazu daljnje sortiraju članovi kako bi se sažetije zapisao:

$$\begin{aligned} & \mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} (\alpha^+(g_c^+ + g_m^+) + \alpha^-(g_c^- + g_m^-)) = \\ & = \frac{v_0}{2} (g_c^+ + g_m^+ - \alpha^+(g_c^+ + g_m^+)(g_c^+ + g_m^+) - g_c^- - g_m^- + \alpha^-(g_c^- + g_m^-)(g_c^- + g_m^-)) = \quad (3.36) \\ & = \frac{v_0}{2} ((g_c^+ + g_m^+)(1 - \alpha^+(g_c^+ + g_m^+)) - (g_c^- + g_m^-)(1 - \alpha^-(g_c^- + g_m^-))). \end{aligned}$$

Konačno, dobiva se izraz za brzinu kinetohora:

$$v_{\text{KC}} = \frac{v_0}{2\mu_{\text{KC}}} \frac{(g_c^+ + g_m^+)(1 - \alpha^+(g_c^+ + g_m^+)) - (g_c^- + g_m^-)(1 - \alpha^-(g_c^- + g_m^-))}{\alpha^+(g_c^+ + g_m^+) + \alpha^-(g_c^- + g_m^-)}. \quad (3.37)$$

Ovaj izraz eksplicitno ovisi samo o geometriji sustava pa se položaji kinetohora mogu jednostavno izračunati integriranjem jednadžbe 3.37 u vremenu.

3.4 Parametri u diobenom vretenu tijekom metafaze

Kako bi se iz jednadžbi mogli dobiti rezultati usporedivi sa stvarnim stanicama, potrebno je prvo pažljivo odabrati vrijednosti za parametre kako bi bili što bliži realnim slučajevima. Parametri koji se odnose na geometriju sustava dani su u tablici 3.1, dok su u tablici 3.2 dani ostali parametri, vezani za svojstva motornih proteina, pasivnih *crosslinkera* i kinetohora.

Parametar	Naziv	Iznos	Izvor
$L_0 = L^- + d + L^+$	Duljina diobenog vretena	14 μm	[84]
$D_0 = D^- + d + D^+$	Duljina preklopa premosnih vlakana	6 μm	[84]
d	Udaljenost između sestrijskih kinetohora	1 μm	[84]

Tablica 3.1: Geometrijski parametri u modelu.

Vrijednosti geometrijskih parametara izmjerene su u [84]. Vrijednost za maksimalnu silu motornih proteina f_0 uzeta je iz [99], a vrijednosti za brzinu motornih proteina bez tereta v_0 postavljena je tako da se reproducira brzina premosnih mikrotubula izmjerena u [84] i slična je iznosu brzine klizanja mikrotubula vođenog Eg5 motornim proteinima iz *Xenopus laevis* stanica [34]. Vrijednost za koeficijent efektivnog trenja na kinetohorama μ_{KC} procijenjena je kao omjer maksimalne sile na kinetohorama od 3 pN, izmjerene u [2], i brzine polimerizacije od

Parametar	Naziv	Iznos	Izvor
f_0	Maksimalna sila motornih proteina	5 pN	[99]
v_0	Brzina motornih proteina bez tereta	4 $\mu\text{m}/\text{min}$	procijenjeno
n_m	Gustoća motornih proteina	10 μm^{-1}	procijenjeno
$n_c\mu_c$	Produkt gustoće i koeficijenta trenja pasivnih <i>crosslinkera</i>	1 pNmin/ μm^2	procijenjeno
μ_{KC}	Koeficijent efektivnog trenja na kinetohorama	30 pNmin/ μm	procijenjeno

Tablica 3.2: Preostali parametri u modelu; koji se odnose na motorne proteine, pasivne *crosslinkere* i kinetohore.

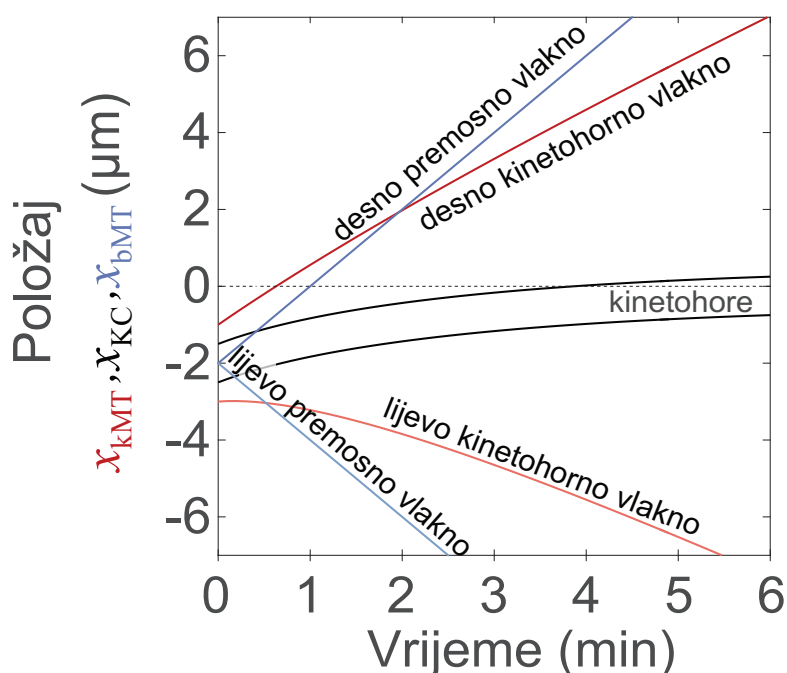
0.1 $\mu\text{m}/\text{min}$, izmjerene u [84]. Gustoća motornih proteina n_m i produkt gustoće i koeficijenta trenja pasivnih *crosslinkera* $n_c\mu_c$ uzeti su kao varijabilni parametri te se njihova vrijednost mijenjala preko više redova veličine kako bi se istražio parametarski prostor. Vrijednosti za ta dva parametra dane u tablici 3.2 odlučene su kao one za koje rezultati najbolje reprezentiraju stvarne biološke situacije.

3.5 Rezultati modela

Kako bi se istražili efikasnost i specifikacije modela pri centriranju kromosoma, prvo se kinetohore u modelu postave na početni položaj 2 μm lijevo od središta diobenog vretena te se promatra njihov put natrag do središta. Rezultati pokazuju da se kinetohore približavaju centru unutar nekoliko minuta za parametre tipične za ljudska diobena vretena (tablice 3.1 i 3.2; slika 3.3), što potvrđuje sposobnost modela da reproducira centriranje kromosoma u metafazi.

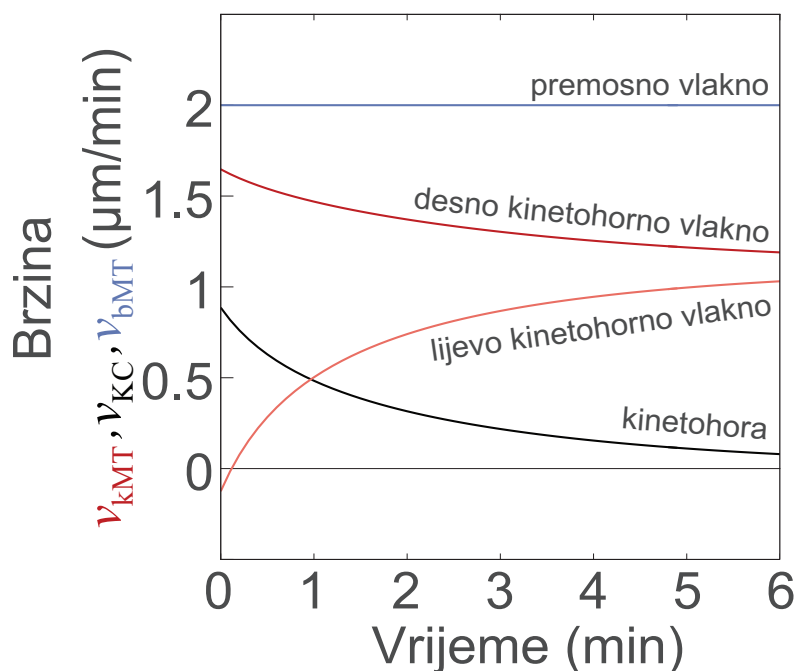
Kada su kinetohore izmaknute, kraće kinetohorno vlakno podvrgnuto je toku prema polu (*poleward flux*) pod manjom brzinom nego duže kinetohorno vlakno. Ta razlika u brzinama odgovorna je za gibanje kinetohora prema središtu diobenog vretena (slika 3.4). Brzina centriranja kinetohora može se zapisati kao prosjek brzina *poleward fluxa* kinetohornih vlakana, $v_{KC} = (v_{kMT}^+ + v_{kMT}^-)/2$. Međutim, s obzirom da je *poleward flux* orijentiran u suprotnom smjeru za oba vlakna pa će brzine imati suprotne predznake, ovaj izraz se može prepraviti kao $v_{KC} = (|v_{kMT}^+| - |v_{kMT}^-|)/2$, odnosno brzina centriranja kinetohora jednaka je polovici razlike iznosa brzina *poleward fluxa* kinetohornih vlakana. Brzine kinetohornih vlakana izjednačavaju

se kako kinetohore prilaze središtu diobenog vretena te se brzina kinetohora smanjuje. *Poleward flux* oba kinetohorna vlakna sporiji je od *poleward fluxa* premosnih vlakana, što omogućava klizanje kinetohornih vlakana pod različitim brzinama tako da mehanizam centriranja može funkcionirati.



Slika 3.3: Rezultati modela koji pokazuju promjene u vremenu položaja kinetohora (crno), kinetohornih vlakana (crveno) i premosnih vlakana (plavo) za kinetohore početno izmknute 2 μm lijevo od središta diobenog vretena. Svi parametri su kao u tablicama 3.1 i 3.2. Slika je adaptirana iz [84].

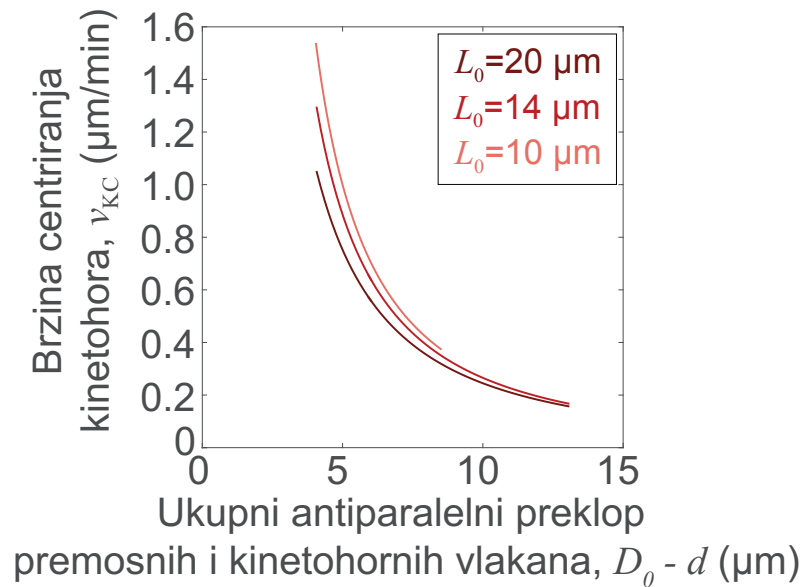
Kako bi se proučilo koje su točno značajke modela ključne za učinkovito centriranje kinetohora, testira se ovisnost brzine kinetohora i prosječne brzine toka kinetohornih vlakana, $v_{\text{kMT}} \equiv (|v_{\text{kMT}}^+| + |v_{\text{kMT}}^-|)/2$, o geometriji modela i o ostalim parametrima u modelu, vezanim za koncentracije motornih proteina i pasivnih *crosslinkera*, brzinu premosnih vlakana te za kinetohore (slike 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 i 3.10). Rezultati za brzine kinetohora gledaju se u položaju kinetohora izmaknutom 2 μm lijevo od središta diobenog vretena, dok se rezultati za prosječnu brzinu toka kinetohornih vlakana gledaju za kinetohore koje se nalaze u središtu diobenog vretena. Rezultati pokazuju da duljina antiparalelnih preklopa između kinetohornih i premosnih vlakana ima snažan utjecaj na učinkovitost centriranja. S obzirom da antiparalelni preklop raste simetrično iz središta diobenog vretena prema polovima, za dovoljno kratke vrijednosti duljine antiparalelnog preklopa kinetohore se neće nalaziti unutar njega te motorni proteini neće djelovati nikakvim silama na njih. Nakon što su kinetohore unutar antiparalelnog preklopa, njegovim



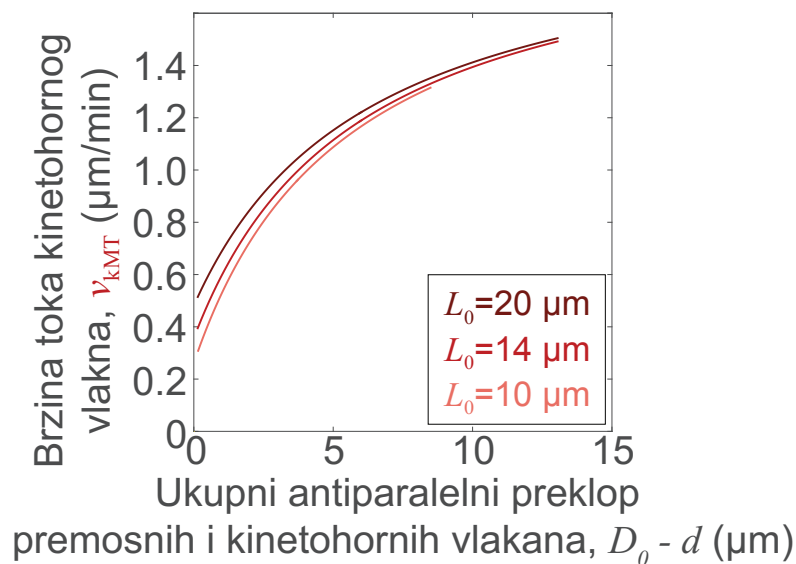
Slika 3.4: Rezultati modela koji pokazuju promjene u vremenu brzina kinetohora (crno), kinetohornih vlakana (crveno) i premosnih vlakana (plavo) za kinetohore početno izmaknute 2 μm lijevo od središta diobenog vretena. Svi parametri su kao u tablicama 3.1 i 3.2. Slika je adaptirana iz [84].

rastom smanjuje se brzina kinetohora te je u promatranom rasponu smanjenje brzine kinetohora otprilike sedmerostruko (slika 3.5). Za isto povećanje antiparalelnog preklopa, brzina toka kinetohornih vlakana raste te se razlika između brzina toka kinetohornih i premosnih vlakana smanjuje s 1.0 na 0.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (slika 3.6). Centriranje je efikasnije za kraće antiparalelne preklope zato što je tada relativna razlika u broju motornih proteina s obje strane kinetohora veća, što uzrokuje veću brzinu centriranja kinetohora. Također, brzina centriranja kinetohora smanjuje se s duljinom diobenog vretena, ali to ima manji učinak od duljine antiparalelnog preklopa.

Mijenjanjem gustoće motornih proteina, dolazi se do zaključka da brzina centriranja kinetohora postiže maksimalnu vrijednost za manje od 20 motora/ μm , to jest za tu vrijednost mehanizam centriranja funkcionira optimalno (slika 3.7). Za vrijednosti gustoće motornih proteina manje od tog optimuma, doprinos pasivnih *crosslinkera* postaje dominantan, što uzrokuje gore centriranje jer pasivni *crosslinkeri* generiraju slabije sile centriranja od motornih proteina. Povećanjem gustoće motornih proteina od optimalne vrijednosti, brzina centriranja kinetohora također opada iz različitog razloga. Kod tog procesa, brzina toka kinetohornih vlakana raste (slika 3.8) te se razlika u brzinama toka kinetohornih i premosnih vlakana smanjuje jer veliki broj motornih proteina klizi kinetohorna vlakna prema polovima velikom brzinom i to uzrokuje

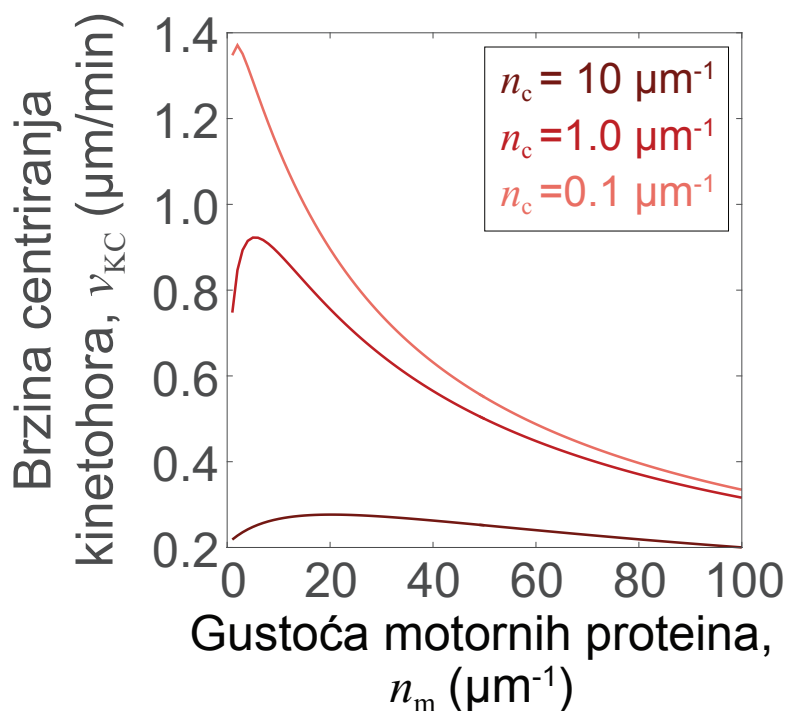


Slika 3.5: Brzine centriranja kinetohora za različite vrijednosti duljine antiparalelnog preklopa premosnih i kinetohornih vlakana i za tri različite vrijednosti duljine diobenog vretena. Svi ostali parametri su kao u tablicama 3.1 i 3.2. Slika je adaptirana iz [84].



Slika 3.6: Brzine toka kinetohornih vlakana za različite vrijednosti duljine antiparalelnog preklopa premosnih i kinetohornih vlakana i za tri različite vrijednosti duljine diobenog vretena. Svi ostali parametri su kao u tablicama 3.1 i 3.2. Slika je adaptirana iz [84].

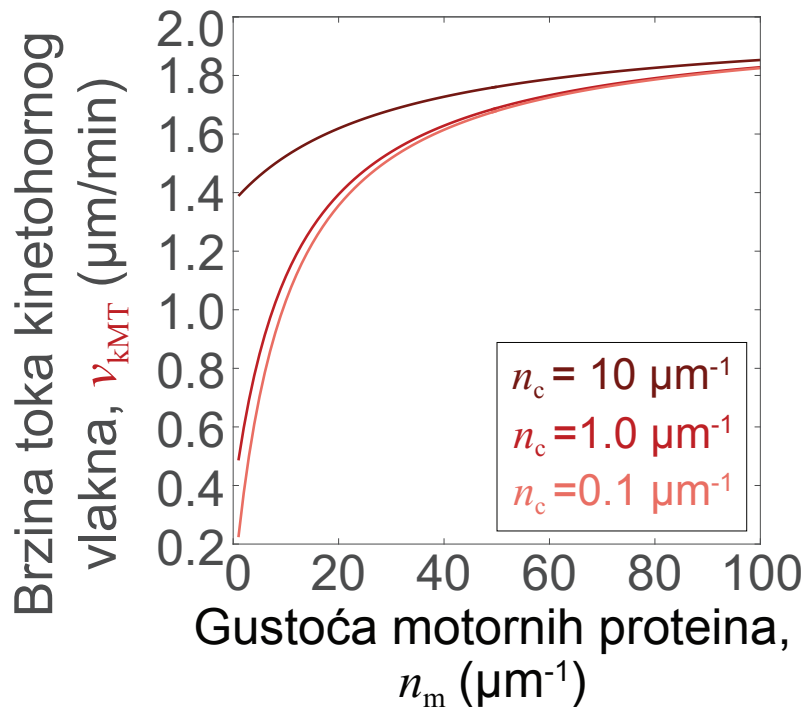
sporije centriranje kinetohora. Također, povećanjem gustoće pasivnih *crosslinkera* dolazi do većeg trenja u paralelnim preklopima kinetohornih i premosnih vlakana, što ubrzava tok kinetohornih vlakana, a usporava brzinu centriranja kinetohora.



Slika 3.7: Brzine centriranja kinetohora za različite vrijednosti gustoće motornih proteina i za tri različite vrijednosti gustoće pasivnih *crosslinkera*. Svi ostali parametri su kao u tablicama 3.1 i 3.2. Slika je adaptirana iz [84].

Kako bi se istražio utjecaj brzine toka premosnih vlakana na centriranje kinetohora, mijenja se brzina motornih proteina bez tereta. Ta brzina je jednaka brzini klizanja nasuprotnih premosnih vlakana u odnosu jedno na drugo, to jest jednaka je dvostrukoj brzini toka premosnih vlakana. Brzina centriranja kinetohora i prosječna brzina toka kinetohornih vlakana rastu s brzinom toka premosnih vlakana (slike 3.9 i 3.10). Također se promatra utjecaj efektivnog trenja na kinetohorima na centriranje kinetohora te se otkriva da se kinetohore brže centriraju, a tok kinetohornih vlakana je manji za veće vrijednosti koeficijenta tog trenja. Tok kinetohornih vlakana uvijek je sporiji od toka premosnih vlakana te je razlika u njima veća što je tok premosnih vlakana brži.

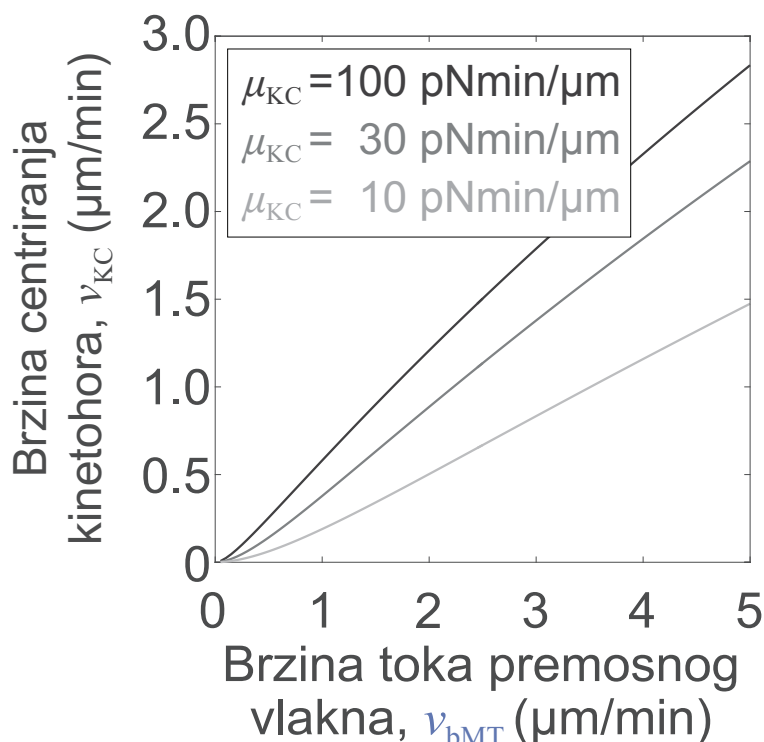
Nadalje, kako bi se detaljnije proučio učinak antiparalelnog preklopa kinetohornih i premosnih vlakana na centriranje kromosoma, istovremeno se mijenja taj parametar s drugim parametrima u modelu te se promatraju brzine centriranja kinetohora i toka kinetohornih vlakana



Slika 3.8: Brzine toka kinetohornih vlakana za različite vrijednosti gustoće motornih proteina i za tri različite vrijednosti gustoće pasivnih *crosslinkera*. Svi ostali parametri su kao u tablicama 3.1 i 3.2. Slika je adaptirana iz [84].

(Slike 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16). Prvo se promatraju promjene u gustoći motornih proteina te rezultati pokazuju dva distinktna režima centriranja (Slike 3.11 i 3.12). Kod kraćeg antiparalelnog preklopa brzina centriranja je veća, a brzina toka kinetohornih vlakana je manja. Te brzine se mijenjaju produljivanjem antiparalelnog preklopa te brzina centriranja naglo opada, a brzina toka kinetohornih vlakana naglo raste. Razlog takve nagle promjene jest to što za kratki antiparalelni preklop kraće kinetohorno vlakno gubi kontakt s premosnim vlaknom te nema sile motornih proteina koja bi se suprotstavljala centriranju kinetohora, uzrokujući veliku brzinu kinetohora, a malenu srednju brzinu toka kinetohornih vlakana. Također, za vrlo male vrijednosti gustoće motornih proteina promjena u režimima je manje nagla. Obje brzine rastu s porastom u gustoći motornih proteina.

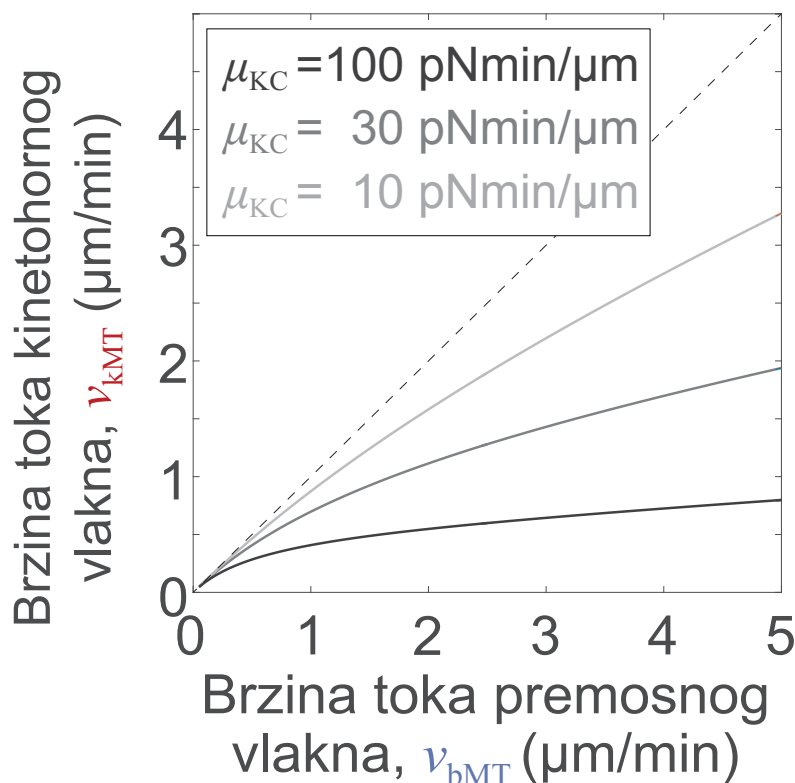
Slično kao za slučaj s motornim proteinima, kada se varira gustoća pasivnih *crosslinkera* brzina kinetohora je veća za kraće antiparalelne preklope, dok brzina toka kinetohornih vlakana pokazuje suprotno ponašanje (Slike 3.13 i 3.14). Međutim, u ovom slučaju brzina centriranja kinetohora opada s porastom u gustoći motornih proteina, dok brzina toka kinetohornih vlakana raste s gustoćom.



Slika 3.9: Brzine centriranja kinetohora za različite vrijednosti brzine toka prenosnih vlakana i za tri različite vrijednosti koeficijenta efektivnog trenja na kinetohorama. Svi ostali parametri su kao u tablicama 3.1 i 3.2. Slika je adaptirana iz [84].

Pri variranju koeficijenta efektivnog trenja na kinetohorama, brzina centriranja kinetohora veća je za kraće antiparalelne preklope, a brzina toka kinetohornih vlakana za duže antiparalelne preklope (Slike 3.15 i 3.16). Brzina centriranja kinetohora raste s porastom u koeficijentu efektivnog trenja na kinetohorama, a brzina toka kinetohornih vlakana opada. Za malene vrijednosti koeficijenta efektivnog trenja na kinetohorama i brzina centriranja kinetohora i brzina toka kinetohornih vlakana zadržavaju slične vrijednosti neovisno o duljini antiparalelnog preklopa.

Promatrajući sve rezultate zajedno, model centriranja vođenog tokom mikrotubula daje ključno predviđanje koje je jedinstveno za ovaj model, a to jest da za kinetohore izmaknute iz središta diobenog vretena dulje kinetohorno vlakno podvrgnuto je bržem *poleward fluxu* od kraćeg (slika 3.17). Brži tok dužeg kinetohornog vlakna vuče kinetohore u smjeru tog vlakna, to jest prema središtu diobenog vretena. Stoga je razlika u *poleward fluxu* sestrinskih kinetohornih vlakana u srži mehanizma centriranja kinetohora tijekom metafaze.



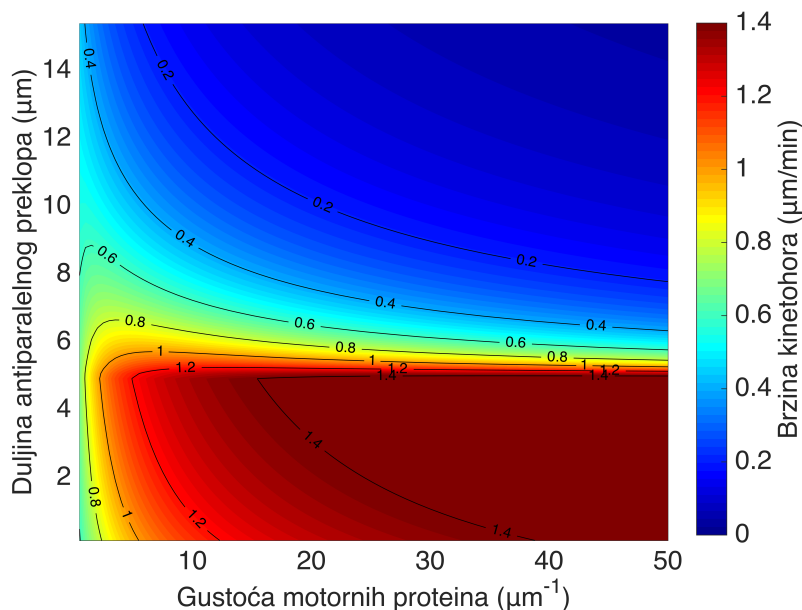
Slika 3.10: Brzine toka kinetohornih vlakana za različite vrijednosti brzine toka premosnih vlakana i za tri različite vrijednosti koeficijenta efektivnog trenja na kinetohorama. Svi ostali parametri su kao u tablicama 3.1 i 3.2. Slika je adaptirana iz [84].

3.6 Usporedba modela s eksperimentom

Kako bismo ustvrdili valjanost predviđanja modela uspoređujemo ih s eksperimentalnim rezultatima dobivenim preko fluorescentne speckle mikroskopije. Sve eksperimente je obavio Patrik Risteski s Tolić Laba na Institutu Ruđer Bošković.

Prvo predviđanje modela jest da je tok premosnih vlakana uvijek brži od toka kinetohornih vlakana. Uspoređivanjem teorijskih i eksperimentalnih rezultata, vidimo da eksperiment potvrđuje tu tvrdnju te su izmjerene vrijednosti za brzine toka kinetohornih i premosnih vlakana skoro jednake teorijskim predviđanjima (Slika 3.18).

Sljedeće je provjeravana veza između brzina toka kinetohornih i premosnih vlakana za različite tretmane na promatranim stanicama te je pokazano da je brzina toka premosnih vlakana veća u svim slučajevima, ali je veza između ta dva toka kompleksna (Slika 3.19). Eksperimenti pokazuju dva režima, jedan u kojem brzine oba toka rastu te drugi u kojem raste samo brzina toka kinetohornih vlakana. Kako bi se ti rezultati usporedili s teorijom, u modelu su varirana

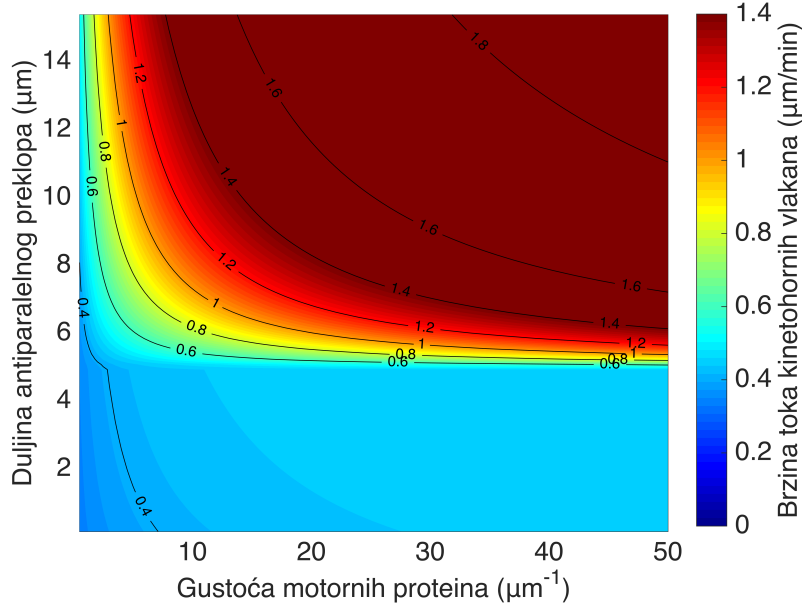


Slika 3.11: 3D graf koji pokazuje vrijednosti brzine centriranja kinetohora za istovremene promjene duljine antiparalelnog preklopa kinetohornih i premosnih vlakana i gustoće motornih proteina. Linije pokazuju vrijednost brzine centriranja kinetohora za odgovarajuću kombinaciju parametara. Ljestvica na desnoj strani pokazuje odnos između boje i brzine centriranja kinetohora. Slika je adaptirana iz [84].

dva različita parametra. Prvi parametar jest brzina motornih proteina bez tereta jer brzina toka premosnih vlakana direktno ovisi o tom parametru. Drugi parametar jest koeficijent efektivnog trenja na kinetohorama, koji opisuje interakciju između kinetohornog vlakna i kinetohore. Ostali parametri su kao što je dano u tablicama 3.1 i 3.2. Rezultati modela se vrlo dobro podudaraju s eksperimentom. Varijacije brzine motornih proteina bez tereta odgovaraju režimu u kojem se brzina oba toka mijenjaju dok varijacije koeficijenta efektivnog trenja na kinetohorama odgovaraju režimu u kojem se mijenja samo brzina kinetohornih vlakana. Sve zajedno, ovi rezultati potvrđuju predviđanje da je tok premosnih vlakana uvijek brži od toka kinetohornih vlakana.

Drugo predviđanje modela jest da duže kinetohorno vlakno ima brži tok od kraćeg kinetohornog vlakna. Eksperimentalni rezultati promatranje speckleova na kinetohornim vlaknima u ovisnosti o normaliziranoj duljini tih vlakana pokazuju da brzina toka kinetohornih vlakana raste s njihovom duljinom, potvrđujući ovo predviđanje (Slika 3.20).

U ovom potpoglavlju pokazano je da ne samo da model daje važna predviđanja za mehanizam centriranja kinetohora preko toka kinetohornih vlakana, već i eksperimentalna mjerenja potvrđuju ta predviđanja te time pokazuju vjerodostojnost modela.



Slika 3.12: 3D graf koji pokazuje vrijednosti brzine toka kinetohornih vlakana za istovremene promjene duljine antiparalelnog preklopa kinetohornih i premosnih vlakana i gustoće motornih proteina. Linije pokazuju vrijednost brzine centriranja kinetohora za odgovarajuću kombinaciju parametara. Ljestvica na desnoj strani pokazuje odnos između boje i brzine toka kinetohornih vlakana. Slika je adaptirana iz [84].

3.7 Model bez aproksimacija

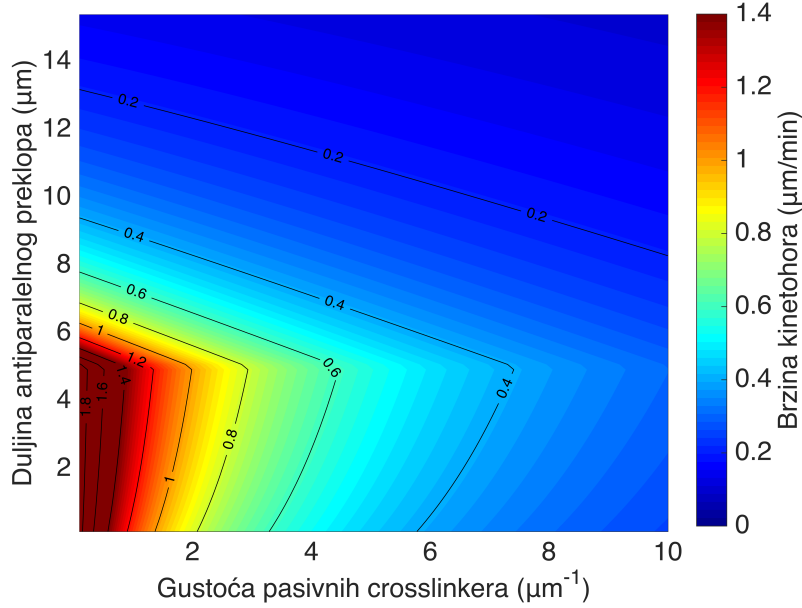
Pri izračunu rezultata modela upotrijebljene su aproksimacije, uvedene u potpoglavlju 3.2. Kako bismo ustvrdili valjanost dobivenih rezultata, model je moguće riješiti i bez aproksimacija te usporediti tako dobivene rezultate s prethodno izračunanim. U tu svrhu, zanemarujemo aproksimaciju dobivenu iz jednadžbe 3.19, to jest fiksnu vrijednost v_{bMT}^{\pm} od $\pm v_0/2$, jer to nije slučaj u stvarnim biološkim sustavima. Međutim, s obzirom da su kinetohore i dalje čvrsto povezane te se kreću zajedno, radi jednostavnosti ostavljamo njihove brzine jednakima, $v_{KC}^+ = v_{KC}^- \equiv v_{KC}$. Također, iako njihove vrijednosti nisu fiksne, iznosi brzina premosnih vlakana s obje strane su i dalje jednaki, $v_{bMT}^+ = -v_{bMT}^- \equiv v_{bMT}$.

Koristeći navedene pretpostavke, osnovne sile u modelu dane su kao:

$$F_{KC}^{\pm} = -\mu_{KC} (v_{KC} - v_{kMT}^{\pm}), \quad (3.38)$$

$$F_m^{\pm} = D^{\pm} n_m f_0 \left(\pm 1 - \frac{v_{kMT}^{\pm} \pm v_{bMT}}{v_0} \right), \quad (3.39)$$

$$F_c^{\pm} = L^{\pm} n_c \mu_c (v_{kMT}^{\pm} \mp v_{bMT}), \quad (3.40)$$



Slika 3.13: 3D graf koji pokazuje vrijednosti brzine centriranja kinetohora za istovremene promjene duljine antiparalelnog preklopa kinetohornih i prenosnih vlakana i gustoće pasivnih *crosslinkera*. Linije pokazuju vrijednost brzine centriranja kinetohora za odgovarajuću kombinaciju parametara. Ljestvica na desnoj strani pokazuje odnos između boje i brzine centriranja kinetohora. Slika je adaptirana iz [84].

$$F_{bMT} = N_{bMT} f_0 \left(1 - \frac{2v_{bMT}}{v_0} \right). \quad (3.41)$$

U ovim i svim daljnjim jednadžbama sve oznake su iste kao i u potpoglavljima 3.1 i 3.3.

Nadalje, osnovne jednadžbe modela iste su kao i prije te glase:

$$F_{KC}^+ = -F_{KC}^-, \quad (3.42)$$

$$F_{KC}^\pm = F_m^\pm - F_c^\pm, \quad (3.43)$$

$$F_{bMT} = -F_m^\mp - F_c^\pm. \quad (3.44)$$

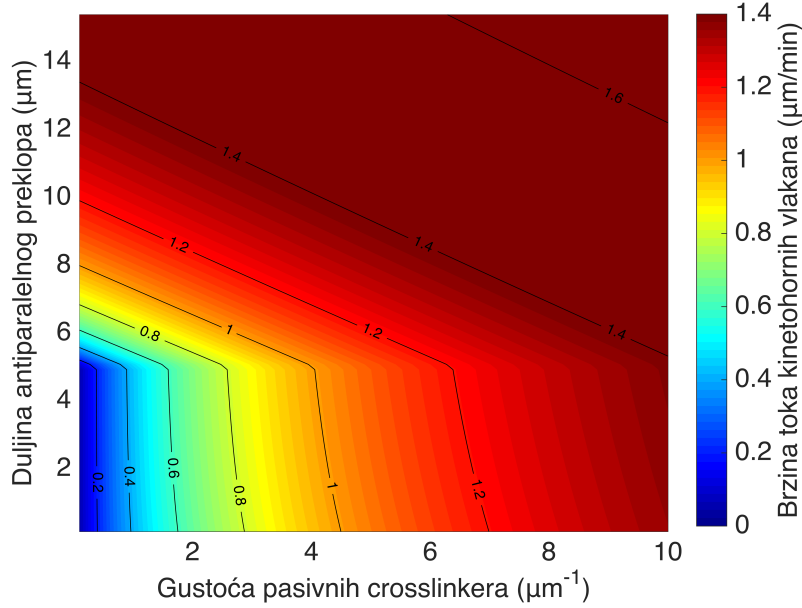
Iz jednadžbi 3.38 i 3.42 dobivamo

$$-\mu_{KC} (v_{KC} - v_{kMT}^+) = \mu_{KC} (v_{KC} - v_{kMT}^-), \quad (3.45)$$

što nam daje izraz za v_{KC} :

$$v_{KC} = \frac{v_{kMT}^+ + v_{kMT}^-}{2}. \quad (3.46)$$

Koristeći jednadžbe 3.39, 3.40, 3.38 i 3.43, možemo izvesti izraze za v_{kMT}^\pm . Za desnu stranu



Slika 3.14: 3D graf koji pokazuje vrijednosti brzine toka kinetohornih vlakana za istovremene promjene duljine antiparalelnog preklopa kinetohornih i prenosnih vlakana i gustoće pasivnih *crosslinkera*. Linije pokazuju vrijednost brzine centriranja kinetohora za odgovarajuću kombinaciju parametara. Ljestvica na desnoj strani pokazuje odnos između boje i brzine toka kinetohornih vlakana. Slika je adaptirana iz [84].

vrijedi:

$$F_c^+ - F_m^+ = -F_{KC}^+, \quad (3.47)$$

$$L^+ n_c \mu_c (v_{kMT}^+ - v_{bMT}) - D^+ n_m f_0 \left(1 - \frac{v_{kMT}^+ + v_{bMT}}{v_0} \right) = \mu_{KC} (v_{KC} - v_{kMT}^+), \quad (3.48)$$

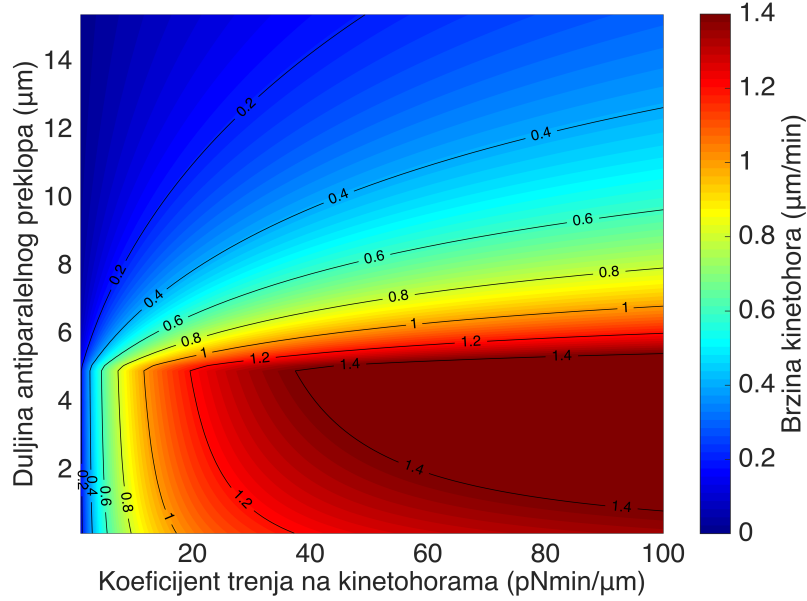
$$\begin{aligned} v_{kMT}^+ \left(L^+ n_c \mu_c + D^+ n_m \frac{f_0}{v_0} + \mu_{KC} \right) = \\ = \mu_{KC} v_{KC} + D^+ n_m f_0 + v_{bMT} \left(L^+ n_c \mu_c - D^+ n_m \frac{f_0}{v_0} \right). \end{aligned} \quad (3.49)$$

Ovdje se uvode tri pokrate radi lakšeg zapisivanja izraza:

$$g_p^\pm \equiv L^\pm n_c \mu_c, \quad (3.50)$$

$$g_{ap}^\pm \equiv D^\pm n_m f_0, \quad (3.51)$$

$$\alpha^\pm \equiv \left(g_p^\pm + \frac{g_{ap}^\pm}{v_0} + \mu_{KC} \right)^{-1}. \quad (3.52)$$



Slika 3.15: 3D graf koji pokazuje vrijednosti brzine centriranja kinetohora za istovremene promjene duljine antiparalelnog preklopa kinetohornih i premosnih vlakana i vrijednosti koeficijenta efektivnog trenja na kinetohorama. Linije pokazuju vrijednost brzine centriranja kinetohora za odgovarajuću kombinaciju parametara. Ljestvica na desnoj strani pokazuje odnos između boje i brzine centriranja kinetohora. Slika je adaptirana iz [84].

Koristeći te pokrate, dolazi se do izraza za v_{kMT}^+ :

$$v_{\text{kMT}}^+ = \alpha^+ \left[\mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} + g_{\text{ap}}^+ + v_{\text{bMT}} \left(g_{\text{p}}^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right]. \quad (3.53)$$

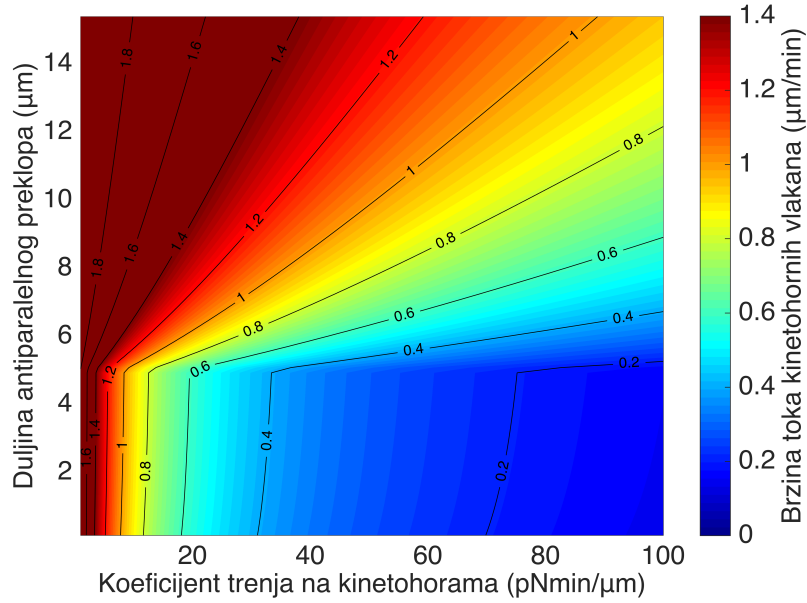
Međutim, ovaj izraz moguće je dalje raspisati koristeći jednadžbu 3.46:

$$v_{\text{kMT}}^+ = \alpha^+ \left[\frac{\mu_{\text{KC}}}{2} v_{\text{kMT}}^+ + \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} v_{\text{kMT}}^- + g_{\text{ap}}^+ + v_{\text{bMT}} \left(g_{\text{p}}^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right], \quad (3.54)$$

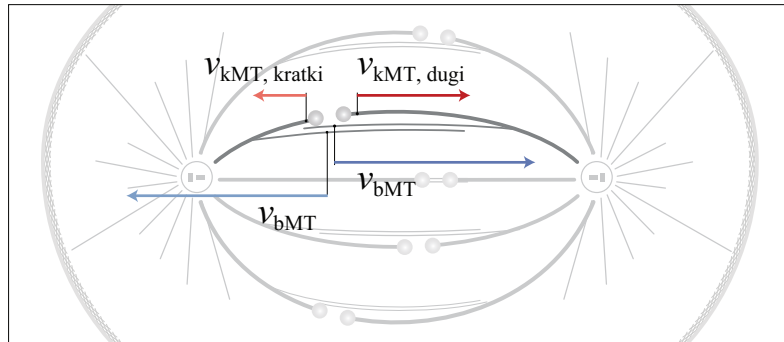
$$v_{\text{kMT}}^+ \left(1 - \alpha^+ \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} \right) = \alpha^+ \left[\frac{\mu_{\text{KC}}}{2} v_{\text{kMT}}^- + g_{\text{ap}}^+ + v_{\text{bMT}} \left(g_{\text{p}}^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right]. \quad (3.55)$$

Analogno tome, može se dobiti izraz i za lijevu stranu:

$$F_{\text{c}}^- - F_{\text{m}}^- = -F_{\text{KC}}^-, \quad (3.56)$$

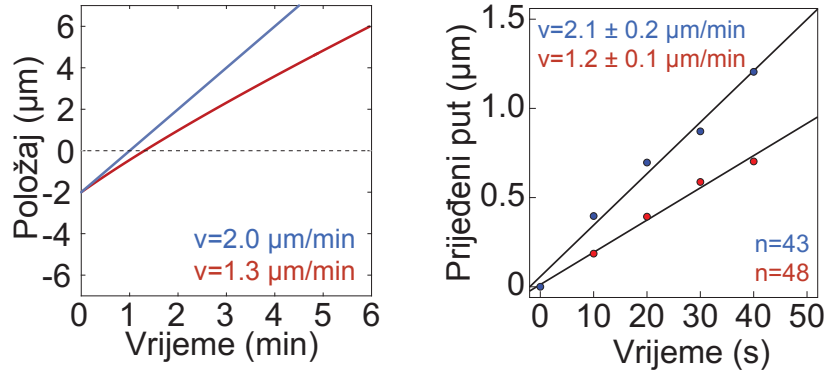


Slika 3.16: 3D graf koji pokazuje vrijednosti brzine toka kinetohornih vlakana za istovremene promjene duljine antiparalelnog preklopa kinetohornih i premosnih vlakana i vrijednosti koeficijenta efektivnog trenja na kinetohorama. Linije pokazuju vrijednost brzine centriranja kinetohora za odgovarajuću kombinaciju parametara. Ljestvica na desnoj strani pokazuje odnos između boje i brzine toka kinetohornih vlakana. Slika je adaptirana iz [84].

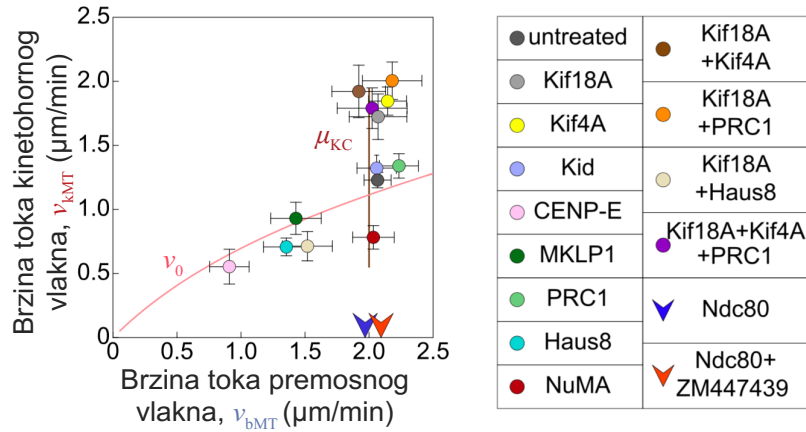


Slika 3.17: Shema diobenog vretena s označenim brzinama toka kinetohornih vlakana (crveno) i premosnih vlakana (plavo). Slika je adaptirana iz [84].

$$L^- n_c \mu_c (v_{kMT}^- + v_{bMT}) - D^- n_m f_0 \left(-1 - \frac{v_{kMT}^- - v_{bMT}}{v_0} \right) = \mu_{KC} (v_{KC} - v_{kMT}^-), \quad (3.57)$$



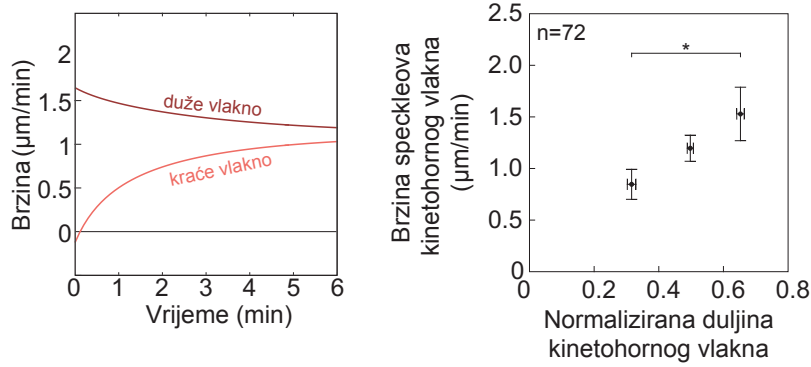
Slika 3.18: Lijevo: graf ovisnosti položaja kinetohornog i prenosnog vlakna o vremenu, dobiven iz teorijskog modela. Desno: graf ovisnosti prijeđenog puta speckleova kinetohornih i prenosnih vlakana o vremenu, dobiven eksperimentalnim mjerenjima. Slika je adaptirana iz [84].



Slika 3.19: Lijevo: graf ovisnosti brzine toka kinetohornih vlakana o brzini toka prenosnih vlakana. Linije predstavljaju teorijska predviđanja za promjene u brzini motornih proteina bez tereta (ružičasto) i koeficijente efektivnog trenja na kinetohorama (smeđe). Kružići predstavljaju srednju vrijednost eksperimentalnih tretmana, a linije na njima standardno odstupanje tih mjerenja. Strelice označavaju eksperimentalne tretmane za koje se nije mogla odrediti brzina toka kinetohornog vlakna. Desno: legenda koja objašnjava kojoj boji odgovara koji eksperimentalni tretman. Slika je adaptirana iz [84].

$$\begin{aligned}
 v_{\text{kMT}}^- \left(L^- n_c \mu_c + D^- n_m \frac{f_0}{v_0} + \mu_{\text{KC}} \right) &= \\
 &= \mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} - D^- n_m f_0 + v_{\text{bMT}} \left(-L^- n_c \mu_c + D^- n_m \frac{f_0}{v_0} \right), \tag{3.58}
 \end{aligned}$$

$$v_{\text{kMT}}^- = \alpha^- \left[\mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} - g_{\text{ap}}^- + v_{\text{bMT}} \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_{\text{p}}^- \right) \right], \tag{3.59}$$



Slika 3.20: Lijevo: graf ovisnosti brzina toka dužeg i kraćeg kinetohornog vlakna o vremenu, dobiven iz teorijskog modela. Desno: graf ovisnosti brzine speckleova kinetohornog vlakna o normaliziranoj duljini kinetohornog vlakna, dobiven eksperimentalnim mjerenjima. Slika je adaptirana iz [84].

$$v_{\text{kMT}}^- = \alpha^- \left[\frac{\mu_{\text{KC}}}{2} v_{\text{kMT}}^+ + \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} v_{\text{kMT}}^- - g_{\text{ap}}^- + v_{\text{bMT}} \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_{\text{p}}^- \right) \right], \quad (3.60)$$

$$v_{\text{kMT}}^- \left(1 - \alpha^- \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} \right) = \alpha^- \left[\frac{\mu_{\text{KC}}}{2} v_{\text{kMT}}^+ - g_{\text{ap}}^- + v_{\text{bMT}} \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_{\text{p}}^- \right) \right]. \quad (3.61)$$

Sada se uvrštavanjem jednadžbe 3.61 u jednadžbu 3.55 i obratno mogu dobiti izrazi za brzine toka kinetohornih vlakana koji ovise samo o brzinama toka premosnih vlakana. Prvo za desnu stranu:

$$\begin{aligned} & v_{\text{kMT}}^+ \left(1 - \alpha^+ \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} \right) = \\ & = \alpha^+ \left[\frac{\mu_{\text{KC}}}{2} \frac{\alpha^-}{1 - \alpha^- \frac{\mu_{\text{KC}}}{2}} \left[\frac{\mu_{\text{KC}}}{2} v_{\text{kMT}}^+ - g_{\text{ap}}^- + v_{\text{bMT}} \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_{\text{p}}^- \right) \right] + \right. \\ & \quad \left. + g_{\text{ap}}^+ + v_{\text{bMT}} \left(g_{\text{p}}^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right], \end{aligned} \quad (3.62)$$

$$\begin{aligned} & v_{\text{kMT}}^+ \left(1 - \alpha^+ \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} - \alpha^+ \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} \frac{\alpha^-}{1 - \alpha^- \frac{\mu_{\text{KC}}}{2}} \right) = \\ & = \alpha^+ \left[\frac{\mu_{\text{KC}}}{2} \frac{\alpha^-}{1 - \alpha^- \frac{\mu_{\text{KC}}}{2}} \left[-g_{\text{ap}}^- + v_{\text{bMT}} \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_{\text{p}}^- \right) \right] + g_{\text{ap}}^+ + v_{\text{bMT}} \left(g_{\text{p}}^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right]. \end{aligned} \quad (3.63)$$

Ovdje uvodimo dvije nove pokrate radi jednostavnosti zapisivanja:

$$\alpha_2^\pm \equiv \frac{\mu_{\text{KC}}}{2} \frac{\alpha^\pm}{1 - \alpha^\pm \frac{\mu_{\text{KC}}}{2}}, \quad (3.64)$$

$$\beta^\pm \equiv 1 - \alpha^\pm \frac{\mu_{KC}}{2} - \alpha^\pm \frac{\mu_{KC}}{2} \frac{\mu_{KC}}{2} \frac{\alpha^\mp}{1 - \alpha^\mp \frac{\mu_{KC}}{2}}. \quad (3.65)$$

S ovim pokratama, jednačba 3.63 može se sada zapisati kao:

$$\begin{aligned} v_{kMT}^+ &= \alpha^+ \beta^+ \left[\alpha_2^- \left[-g_{ap}^- + v_{bMT} \left(\frac{g_{ap}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right] + g_{ap}^+ + v_{bMT} \left(g_p^+ - \frac{g_{ap}^+}{v_0} \right) \right] = \\ &= \alpha^+ \beta^+ \left[g_{ap}^+ - \alpha_2^- g_{ap}^- + v_{bMT} \left(g_p^+ - \frac{g_{ap}^+}{v_0} + \alpha_2^- \left(\frac{g_{ap}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right) \right]. \end{aligned} \quad (3.66)$$

Analogno se dobije i izraz za lijevu stranu:

$$\begin{aligned} &v_{kMT}^- \left(1 - \alpha^- \frac{\mu_{KC}}{2} \right) = \\ &= \alpha^- \left[\frac{\mu_{KC}}{2} \frac{\alpha^+}{1 - \alpha^+ \frac{\mu_{KC}}{2}} \left[\frac{\mu_{KC}}{2} v_{kMT}^- + g_{ap}^+ + v_{bMT} \left(g_p^+ - \frac{g_{ap}^+}{v_0} \right) \right] - \right. \\ &\quad \left. - g_{ap}^- + v_{bMT} \left(\frac{g_{ap}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right], \end{aligned} \quad (3.67)$$

$$\begin{aligned} &v_{kMT}^- \left(1 - \alpha^- \frac{\mu_{KC}}{2} - \alpha^- \frac{\mu_{KC}}{2} \frac{\mu_{KC}}{2} \frac{\alpha^+}{1 - \alpha^+ \frac{\mu_{KC}}{2}} \right) = \\ &= \alpha^- \left[\frac{\mu_{KC}}{2} \frac{\alpha^+}{1 - \alpha^+ \frac{\mu_{KC}}{2}} \left[g_{ap}^+ + v_{bMT} \left(g_p^+ - \frac{g_{ap}^+}{v_0} \right) \right] - g_{ap}^- + v_{bMT} \left(\frac{g_{ap}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right], \end{aligned} \quad (3.68)$$

$$\begin{aligned} v_{kMT}^- &= \alpha^- \beta^- \left[\alpha_2^+ \left[g_{ap}^+ + v_{bMT} \left(g_p^+ - \frac{g_{ap}^+}{v_0} \right) \right] - g_{ap}^- + v_{bMT} \left(\frac{g_{ap}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right] = \\ &= \alpha^- \beta^- \left[\alpha_2^+ g_{ap}^+ - g_{ap}^- + v_{bMT} \left(\frac{g_{ap}^-}{v_0} - g_p^- + \alpha_2^+ \left(g_p^+ - \frac{g_{ap}^+}{v_0} \right) \right) \right]. \end{aligned} \quad (3.69)$$

Sljedeće, kako bi se iz ovih izraza mogla izračunati brzina centriranja kinetohora, potrebno je još odrediti izraz za brzinu toka prenosnih vlakana.

Koristeći jednačbe 3.44, 3.39, 3.40, 3.41, 3.66 i 3.69 izvodi se izraz za v_{bMT} :

$$-F_m^- - F_c^+ = F_{bMT}, \quad (3.70)$$

$$-D^- n_m f_0 \left(-1 - \frac{v_{kMT}^- - v_{bMT}}{v_0} \right) - L^+ n_c \mu_c (v_{kMT}^+ - v_{bMT}) = N_{bMT} f_0 \left(1 - \frac{2v_{bMT}}{v_0} \right), \quad (3.71)$$

$$D^- n_m f_0 \left(1 + \frac{v_{kMT}^- - v_{bMT}}{v_0} \right) - L^+ n_c \mu_c (v_{kMT}^+ - v_{bMT}) = N_{bMT} f_0 \left(1 - \frac{2v_{bMT}}{v_0} \right), \quad (3.72)$$

$$v_{\text{bMT}} \left(2N_{\text{bMT}} \frac{f_0}{v_0} - D^- n_m f_0 + L^+ n_c \mu_c \right) = \quad (3.73)$$

$$= N_{\text{bMT}} f_0 - D^- n_m f_0 - D^- n_m \frac{f_0}{v_0} v_{\text{kMT}}^- + L^+ n_c \mu_c v_{\text{kMT}}^+,$$

$$v_{\text{bMT}} \left(2N_{\text{bMT}} \frac{f_0}{v_0} + g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} \right) = N_{\text{bMT}} f_0 - g_{\text{ap}}^- + v_{\text{kMT}}^+ g_p^+ - v_{\text{kMT}}^- \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0}, \quad (3.74)$$

$$v_{\text{bMT}} \left(2N_{\text{bMT}} \frac{f_0}{v_0} + g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} \right) =$$

$$= N_{\text{bMT}} f_0 - g_{\text{ap}}^- + g_p^+ \alpha^+ \beta^+ \left[g_{\text{ap}}^+ - \alpha_2^- g_{\text{ap}}^- + v_{\text{bMT}} \left(g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} + \alpha_2^- \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right) \right] - \quad (3.75)$$

$$- \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} \alpha^- \beta^- \left[\alpha_2^+ g_{\text{ap}}^+ - g_{\text{ap}}^- + v_{\text{bMT}} \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^- + \alpha_2^+ \left(g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right) \right],$$

$$v_{\text{bMT}} \left[2N_{\text{bMT}} \frac{f_0}{v_0} + g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^+ \alpha^+ \beta^+ \left(g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} + \alpha_2^- \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right) + \right.$$

$$\left. + \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} \alpha^- \beta^- \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^- + \alpha_2^+ \left(g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right) \right] = \quad (3.76)$$

$$= N_{\text{bMT}} f_0 - g_{\text{ap}}^- + g_p^+ \alpha^+ \beta^+ (g_{\text{ap}}^+ - \alpha_2^- g_{\text{ap}}^-) - \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} \alpha^- \beta^- (\alpha_2^+ g_{\text{ap}}^+ - g_{\text{ap}}^-),$$

$$v_{\text{bMT}} \left[2N_{\text{bMT}} \frac{f_0}{v_0} + g_p^+ \left[1 - \alpha^+ \beta^+ \left(g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} + \alpha_2^- \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right) \right] - \right.$$

$$\left. - \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} \left[1 - \alpha^- \beta^- \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^- + \alpha_2^+ \left(g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right) \right] \right] = \quad (3.77)$$

$$= N_{\text{bMT}} f_0 - g_{\text{ap}}^- + g_p^+ \alpha^+ \beta^+ (g_{\text{ap}}^+ - \alpha_2^- g_{\text{ap}}^-) - \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} \alpha^- \beta^- (\alpha_2^+ g_{\text{ap}}^+ - g_{\text{ap}}^-).$$

Ovdje sada uvodimo još jednu pokratu:

$$\gamma \equiv \left[2N_{\text{bMT}} \frac{f_0}{v_0} + g_p^+ \left[1 - \alpha^+ \beta^+ \left(g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} + \alpha_2^- \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^- \right) \right) \right] - \right.$$

$$\left. - \frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} \left[1 - \alpha^- \beta^- \left(\frac{g_{\text{ap}}^-}{v_0} - g_p^- + \alpha_2^+ \left(g_p^+ - \frac{g_{\text{ap}}^+}{v_0} \right) \right) \right] \right]^{-1}. \quad (3.78)$$

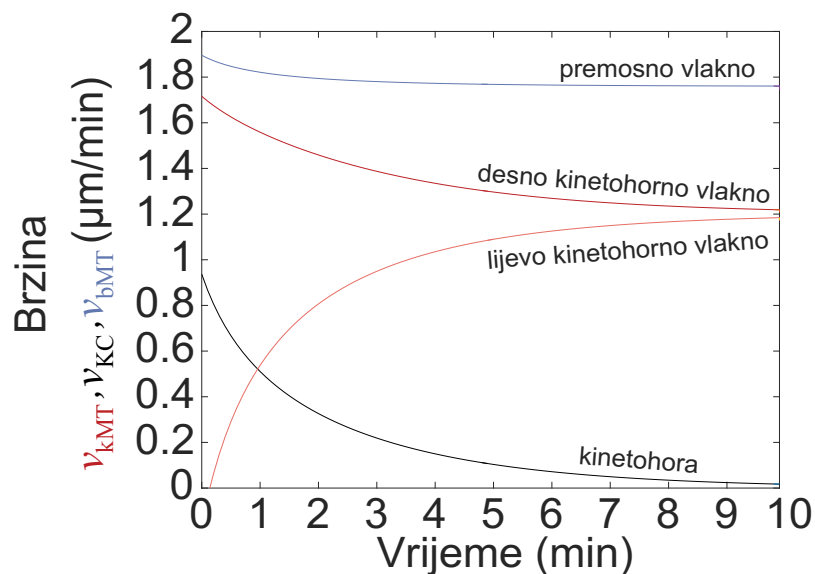
Koristeći tu pokratu, možemo zapisati konačni izraz za brzinu toka premosnih vlakana:

$$v_{bMT} = \gamma \left[N_{bMT} f_0 - g_{ap}^- + g_p^+ \alpha^+ \beta^+ (g_{ap}^+ - \alpha_2^- g_{ap}^-) - \frac{g_{ap}^-}{v_0} \alpha^- \beta^- (\alpha_2^+ g_{ap}^+ - g_{ap}^-) \right]. \quad (3.79)$$

Ovaj izraz ovisi eksplicitno samo o geometriji sustava. Konačno, brzina centriranja kinetohora može se izračunati iz jednadžbe 3.46 koristeći jednadžbe 3.66, 3.69 i 3.79.

3.8 Usporedba modela s i bez aproksimacija

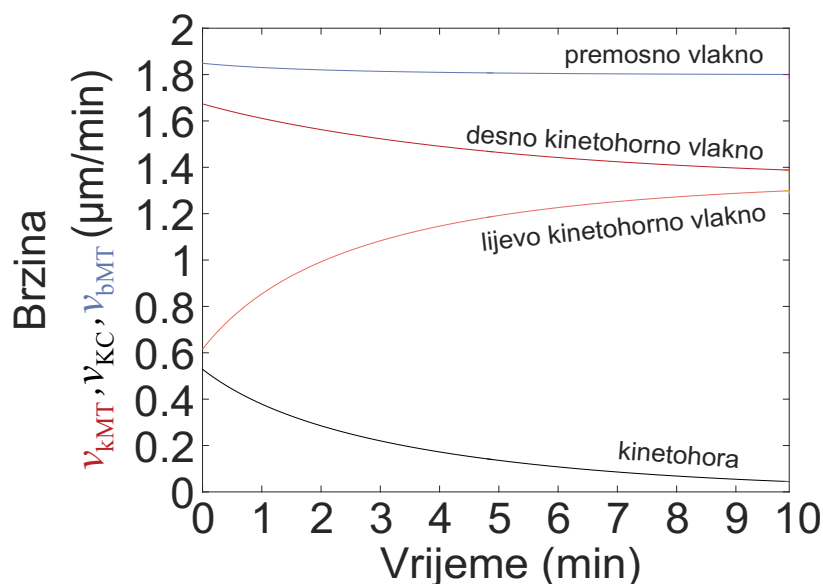
Kako bi se uvjerali da je uistinu u redu koristiti aproksimacije uvedene u 3.2, sada ćemo usporediti rezultate iz 3.5 s rezultatima koji će biti izračunati preko jednadžbi izvedenih u 3.7. Promatranjem brzina kinetohora, toka kinetohornih vlakana i toka premosnih vlakana (Slika 3.21) može se primijetiti da rezultati ne odstupaju mnogo od prijašnjih. Detaljniji uvid u rezultate pokazuje da vrijednosti brzine toka premosnih vlakana variraju od 1.89 $\mu\text{m}/\text{min}$ do 1.76 $\mu\text{m}/\text{min}$, što je odstupanje od približno 5.5%-12%. Takvo odstupanje je prihvatljivo za ove rezultate.



Slika 3.21: Graf brzine centriranja kinetohora, brzina toka kinetohornih vlakana i brzine toka premosnih vlakana u ovisnosti o vremenu za rješenje modela bez aproksimacija.

S obzirom da brzine ovise o duljinama preklopa između kinetohornih i premosnih vlakana, produljujemo duljinu antiparalelnog preklopa sa 6 μm na 8 μm kako bi vidjeli hoće li to promijeniti odstupanje (Slika 3.22). Za takav preklap, vrijednosti brzine toka premosnih vlakana

variraju od 1.85 $\mu\text{m}/\text{min}$ do 1.8 $\mu\text{m}/\text{min}$, odnosno odstupanje jest od 7.5% do 10%, to jest odstupanje je nešto veće pri početku centriranja, ali manje na kraju. Međutim, za sve vrijednosti odstupanje je i dalje prihvatljivo.

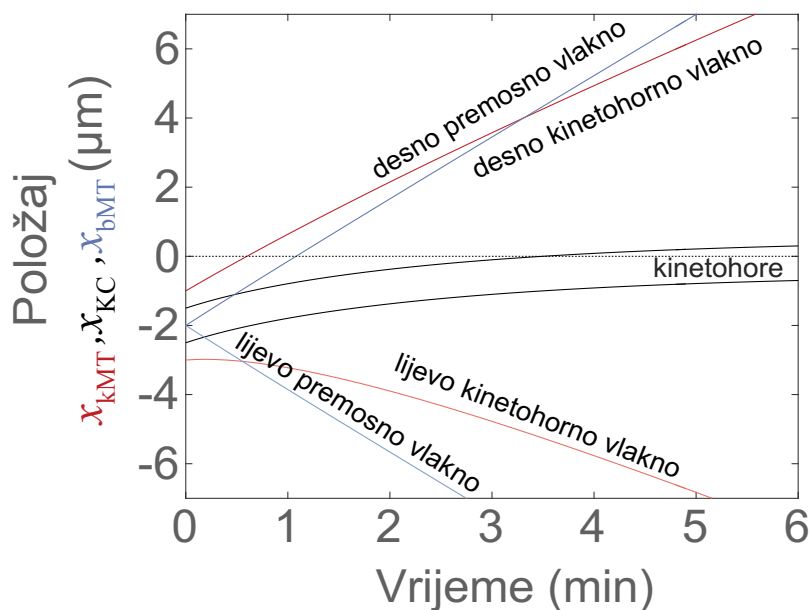


Slika 3.22: Graf brzine centriranja kinetohora, brzina toka kinetohornih vlakana i brzine toka premosnih vlakana u ovisnosti o vremenu za rješenje modela bez aproksimacija i za produljen antiparalelni preklap.

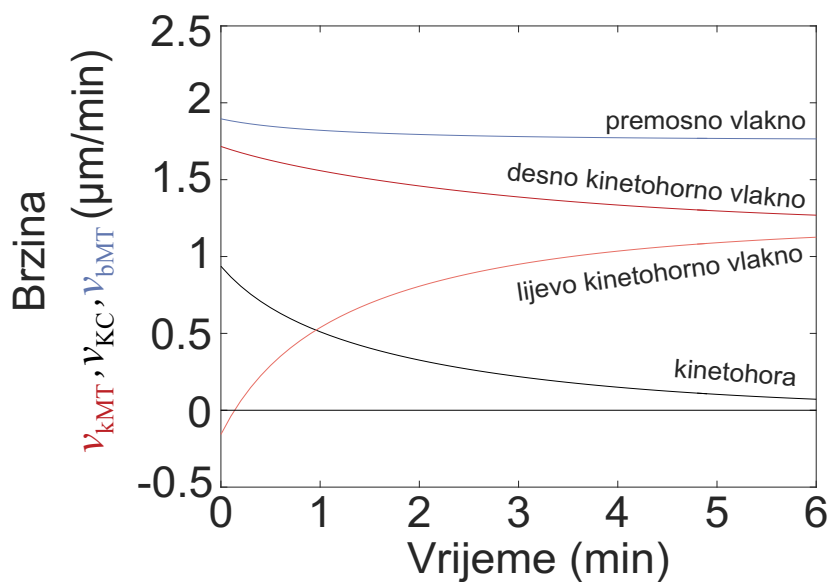
Sljedeće, prikazujemo na grafovima ovisnost položaja i brzina kinetohora, kinetohornih vlakana i premosnih vlakana o istom vremenskom periodu kao na slikama 3.3 i 3.4 kako bi se vizualno usporedili rezultati modela s i bez aproksimacija (Slike 3.23 i 3.24). Osim očekivanih razlika kod premosnih vlakana, nisu uočljive ikakve veće razlike kod položaja ni brzina centriranja kinetohora i toka kinetohornih vlakana.

Nadalje, promatraju se isti rezultati za antiparalelni preklap produljen na 8 μm (Slike 3.25 i 3.26). Kod ovih rezultata vidi se da je centriranje kinetohora neznatno lošije. Sukladno tome, brzina toka lijevog kinetohornog vlakna malo je veća nego kod slučaja s antiparalelnim preklapom od 6 μm .

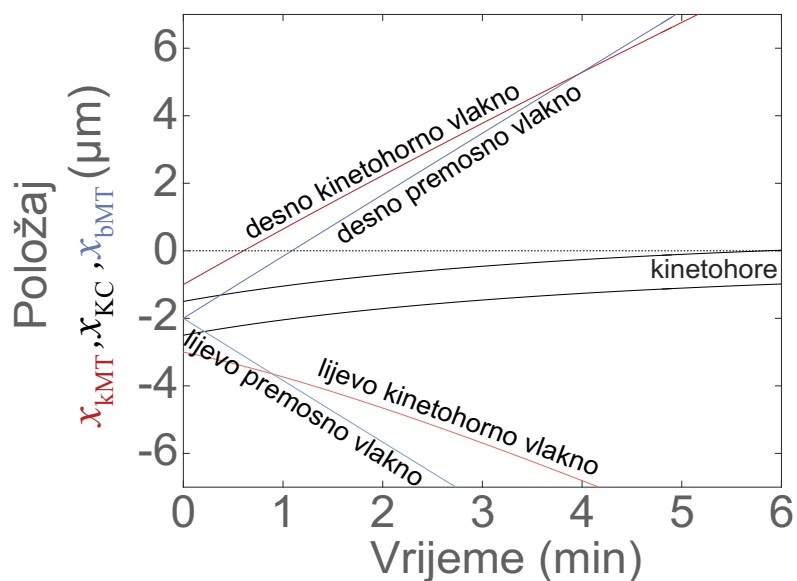
Sve u svemu, ovi rezultati pokazuju da rezultati modela bez aproksimacija za iste parametre daju gotovo identične rezultate kao i rezultati modela s aproksimacijama. Iz toga se može zaključiti da su uzete aproksimacije u potpunosti valjane te su rezultati pokazani u potpoglavlju 3.5 relevantni za stvarne biološke sustave.



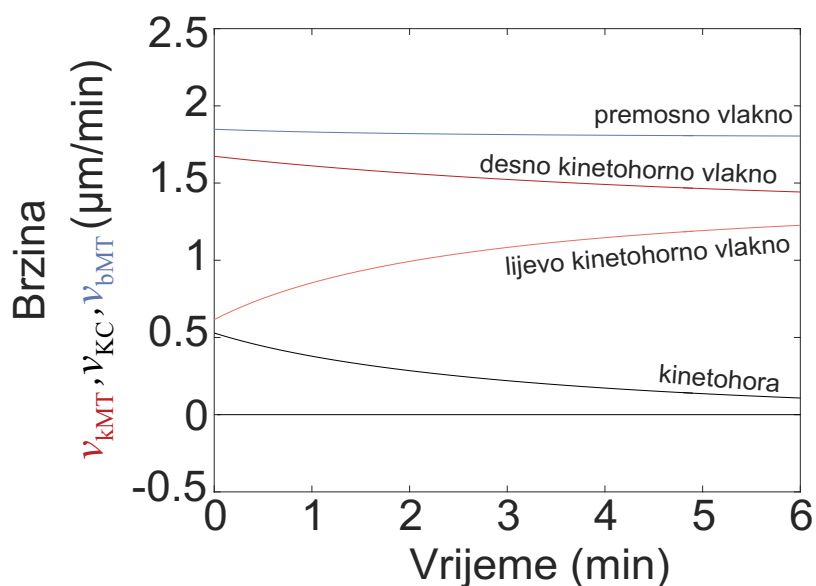
Slika 3.23: Graf položaja kinetohora, kinetohornih vlakana premosnih vlakana u ovisnosti o vremenu za rješenje modela bez aproksimacija. Vrijednosti na osima su uzete kako bi se olakšala usporedba s prethodnih rezultatima.



Slika 3.24: Graf brzine centriranja kinetohora, brzina toka kinetohornih vlakana i brzine toka premosnih vlakana u ovisnosti o vremenu za rješenje modela bez aproksimacija. Vrijednosti na osima su uzete kako bi se olakšala usporedba s prethodnih rezultatima.



Slika 3.25: Graf položaja kinetohora, kinetohornih vlakana i premosnih vlakana u ovisnosti o vremenu za rješenje modela bez aproksimacija i za produljen antiparalelni preklop. Vrijednosti na osima su uzete kako bi se olakšala usporedba s prethodnih rezultatima.



Slika 3.26: Graf brzine centriranja kinetohora, brzina toka kinetohornih vlakana i brzine toka premosnih vlakana u ovisnosti o vremenu za rješenje modela bez aproksimacija i za produljen antiparalelni preklop. Vrijednosti na osima su uzete kako bi se olakšala usporedba s prethodnih rezultatima.

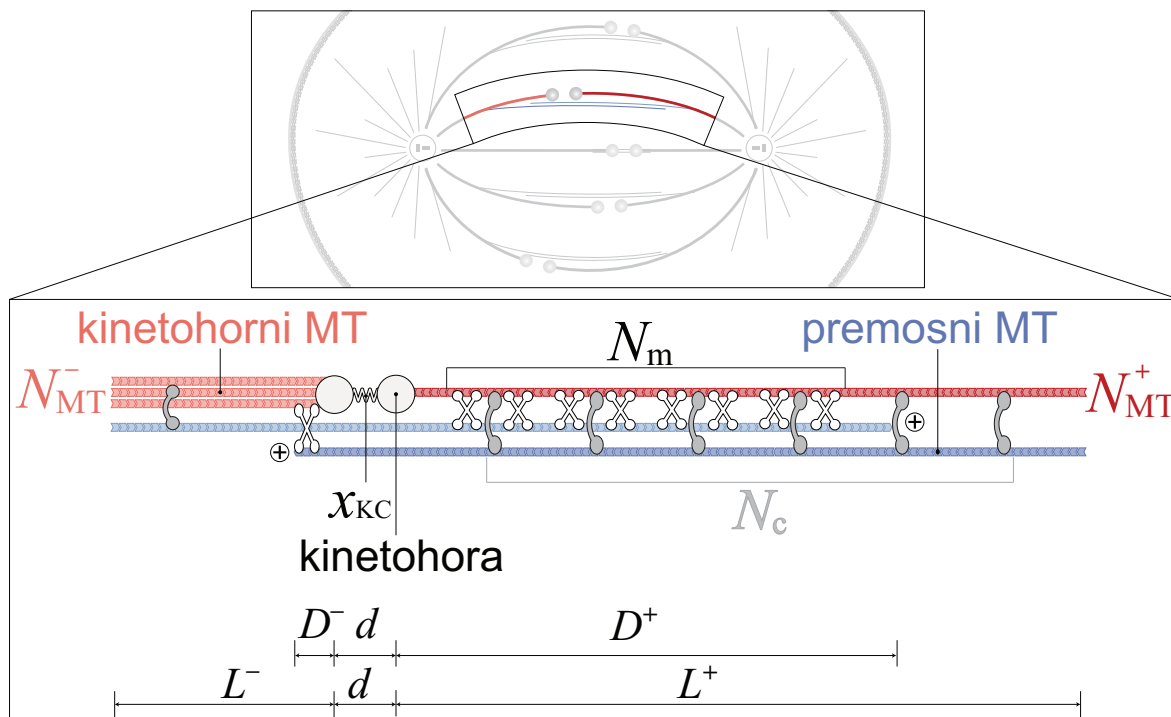
Poglavlje 4

Model za kongresiju kromosoma u prometafazi

Kongresija kromosoma u prometafazi je proces gibanja kromosoma prema ekvatoru diobenog vretena sličan centriranju u metafazi. Stoga prirodno slijedi ideja da bi se model centriranja kromosoma u metafazi vođenog *poleward fluxom* mogao primijeniti i na kongresiju u prometafazi, uz neke preinake. Glavna razlika u diobenom vretenu između metafaze i prometafaze jest ta što su u metafazi kromosomi bliže metafaznoj ravnini te su brojevi mikrotubula na oba kromosoma podjednaki, dok se na udaljenijim kromosomima u prometafazi nalazi više mikrotubula sa strane bliže polu. Iz tog će razloga model za kongresiju u prometafazi morati imati kromosome više izmaknute iz središta diobenog vretena, kao i razliku u broju kinetohornih mikrotubula na lijevoj i desnoj kinetohori (Slika 4.1). S obzirom da ukupna duljina preklopa sada ovisi i o broju mikrotubula u preklopu, sile u modelu će ovisiti o ravnoteži većeg broja mikrotubula s bližeg pola i većoj duljini mikrotubula s udaljenijeg pola. Ostatak modela funkcionira isto kao i model za metafazu. Motorni proteini i pasivni *crosslinkeri* se nakupljaju duž antiparalelnih i paralelnih preklopa te generiraju sile na kinetohore ovisne o ukupnoj duljini tih preklopa. Kao i za metafazu, ovakav model gdje kongresija kromosoma u prometafazi ovisi o ravnoteži sila na sestrinskim kinetohornim vlaknima nije prethodno uveden.

4.1 Sile u modelu

U modelu za kongresiju kromosoma u prometafazi, transport kromosoma vode sile kojima djeluju kinetohorna vlakna. Kako bi se opisala dinamika tog procesa, koristi se ravnoteža sila između viskoznog trenja na kromosomima i sile kojima djeluju mikrotubuli prikvačeni za kine-



Slika 4.1: Shema diobenog vretena (gore) i shema modela (dolje). Kinetohorni mikrotubuli (crveno) idu od rubova do elastično povezanih kinetohora (krugovi povezani oprugom) te se nalaze u većem broju na lijevoj strani. Premosni mikrotubuli (plavo) idu od rubova jedan prema drugom. Motorni proteini vežu se između antiparalelnih mikrotubula, a pasivni *crosslinkeri* između paralelnih mikrotubula. Eksponenti + i – označavaju desnu, odnosno lijevu stranu modela.

tohore s obje strane:

$$\xi \frac{dx_{KC}}{dt} = F_{KC}^+ + F_{KC}^-, \quad (4.1)$$

gdje je ξ koeficijent trenja sustava koji se sastoji od kinetohore i kromosoma, a $\frac{dx_{KC}}{dt}$ derivacija u vremenu položaja kinetohora. Sila kojom kinetohorna vlakna povlače kromosome računa se kao produkt broja mikrotubula u kinetohornom vlaknu i sile jednog mikrotubula:

$$F_{KC}^\pm = N_{MT}^\pm F_{MT}^\pm. \quad (4.2)$$

Eksponenti + i – označavaju desnu, odnosno lijevu stranu modela u ovim i svim budućim izrazima. Motorni proteini i pasivni *crosslinkeri* generiraju sile na kinetohornom mikrotubulu za kojeg su prikvačeni i te se sile računaju kao:

$$F_{MT}^\pm = N_m^\pm f_m^\pm + N_c^\pm f_c^\pm, \quad (4.3)$$

gdje je ukupna sila kojom djeluju motorni proteini dana kao umnožak njihovog broja, N_m^\pm , i sile jednog motornog proteina, f_m^\pm , a ukupna sila kojom djeluju pasivni *crosslinkeri* je analogno tome dana kao umnožak njihovog broja, N_c^\pm , i sile jednog pasivnog *crosslinkera*, f_c^\pm . U ovom modelu svi mikrotubuli unutar kinetohornog vlakna imaju jednaku duljinu.

Motorni proteini i pasivni *crosslinkeri* homogeno su raspoređeni duž antiparalelnih, odnosno paralelnih preklopa. Broj motornih proteina računa se iz duljine antiparalelnog preklopa kinetohornih i premosnih vlakana i linearne gustoće motornih proteina:

$$N_m^\pm = D^\pm \rho_m. \quad (4.4)$$

Analogno tome, broj pasivnih *crosslinkera* računa se kao umnožak duljine paralelnog preklopa kinetohornih i premosnih vlakana i linearne gustoće pasivnih *crosslinkera*:

$$N_c^\pm = L^\pm \rho_c. \quad (4.5)$$

Sile pojedinih motornih proteina, f_m^\pm , dobivene su iz linearne relacije između brzine i sile, a sile pojedinih pasivnih *crosslinkera*, f_c^\pm , i sile kinetohora opisuju se kao sile trenja. Te će sile biti detaljno opisane u sljedećeg potpoglavljju.

4.2 Računanje brzina kinetohornih mikrotubula i kinetohora

Model opisuje gibanje u vremenu t para sestrinskih kinetohora sa središtem u točki x_{KC} i razmakom d (Slika 4.1). Ishodište koordinatnog sustava nalazi se u središtu diobenog vretena duljine L , tako da su rubovi diobenog vretena na položajima $L/2$ i $-L/2$. Kinetohorni mikrotubuli protežu se od rubova diobenog vretena do kinetohora i imaju duljine $L^\pm = L/2 - d/2 \mp x_{KC}$, a broj im je označen kao N_{kMT}^\pm . Eksponenti $+$ i $-$ označavaju desnu, odnosno lijevu stranu modela u ovim i svim budućim izrazima. Premosni mikrotubuli protežu se sa suprotnih rubova diobenog vretena jedan prema drugome i stvaraju preklap duljine D , tako da su plus krajevi premosnih mikrotubula na položajima $D/2$ i $-D/2$. Kako bi se opisao *poleward flux* mikrotubula, prate se proizvoljni položaji duž mikrotubula, označeni s x_{kMT}^\pm za kinetohorne mikrotubule i x_{bMT}^\pm za premosne mikrotubule. Za sve položaje brzine se računaju kao derivacije u vremenu tih položaja:

$$v_{KC} = \frac{dx_{KC}}{dt}, \quad (4.6)$$

$$v_{kMT}^\pm = \frac{dx_{kMT}^\pm}{dt}, \quad (4.7)$$

$$v_{\text{bMT}}^{\pm} = \frac{dx_{\text{bMT}}^{\pm}}{dt}. \quad (4.8)$$

Brzina rasta kinetohornih mikrotubula računa se kao brzina kojom se kinetohora udaljava od proizvoljne točke na kinetohornom mikrotubulu:

$$v_{\text{g}}^{\pm} = \mp (v_{\text{KC}} - v_{\text{kMT}}^{\pm}). \quad (4.9)$$

Kako bi se opisala dinamika kongresije kromosoma, računaju se sile koje djeluju na kinetohore i mikrotubule te se koristeći te sile rješavaju jednadžbe 4.1 i 4.3. Vučna sila kojom kinetohorni mikrotubuli djeluju na kinetohore ovisi o brzini njihova rasta:

$$F_{\text{KC}}^{\pm} = \pm \mu_{\text{KC}} v_{\text{g}}^{\pm}, \quad (4.10)$$

gdje je μ_{KC} koeficijent efektivnog trenja na kinetohorima. Ovaj je izraz pojednostavljena verzija odnosa između sile i brzine izmjerenog za kinetohore [2].

Motorni proteini generiraju aktivne vučne sile, a njihova fizikalna svojstva dana su linearnom relacijom između sile i brzine:

$$v_{\text{m}}(f) = v_0 \left(1 - \frac{f}{f_0} \right), \quad (4.11)$$

gdje je v_0 brzina motornih proteina bez tereta, a f_0 maksimalna sila motornih proteina. Motorni proteini koji povezuju kinetohorne i prenosne mikrotubule generiraju svoje klizanje s brzinom:

$$v_{\text{kMT}}^{\pm} - v_{\text{bMT}}^{\mp} = \pm v_{\text{m}}(\pm f_{\text{m}}^{\pm}) = \pm v_0 \left(1 \mp \frac{f_{\text{m}}^{\pm}}{f_0} \right) = v_0 \left(\pm 1 - \frac{f_{\text{m}}^{\pm}}{f_0} \right). \quad (4.12)$$

Pasivni *crosslinkeri* generiraju sile gušenja te se njihova fizikalna svojstva opisuju kao trenje:

$$f_{\text{c}}^{\pm} = -\mu_{\text{c}} (v_{\text{kMT}}^{\pm} - v_{\text{bMT}}^{\pm}), \quad (4.13)$$

gdje je μ_{c} koeficijent trenja pasivnih *crosslinkera*.

U prometafaznom diobenom vretenu, prenosni mikrotubuli pojavljuju se u mnogo većem broju od kinetohornih mikrotubula jednog para sestrinskih kinetohora te se mogu smatrati objektom na koji primarno ne utječu sile generirane u interakcijama s kinetohornim mikrotubulima. Iz tog razloga prenosni se mikrotubuli mogu aproksimirati kao objekt s konstantnim *poleward fluxom*:

$$v_{\text{bMT}}^{\pm} = \pm \frac{v_0}{2}. \quad (4.14)$$

Kako bi se odredili izrazi za brzine toka kinetohornih mikrotubula, koristi se jednadžba 4.3. Za desnu stranu ona se može zapisati kao:

$$F_{MT}^+ = N_m^+ f_m^+ + N_c^+ f_c^+. \quad (4.15)$$

Korištenjem izraza 4.2, 4.4, 4.5, 4.9 i 4.10 ova jednadžba poprima sljedeći oblik:

$$-\frac{\mu_{KC}}{N_{MT}^+} (v_{KC} - v_{kMT}^+) = D^+ \rho_m \frac{f_0}{v_0} (v_0 + v_{bMT}^- - v_{kMT}^+) - L^+ \rho_c \mu_c (v_{kMT}^+ - v_{bMT}^+), \quad (4.16)$$

koji se uz izraz 4.14 i sređivanje predznaka može zapisati kao:

$$\frac{\mu_{KC}}{N_{MT}^+} (v_{KC} - v_{kMT}^+) = L^+ \rho_c \mu_c \left(v_{kMT}^+ - \frac{v_0}{2} \right) - D^+ \rho_m \frac{f_0}{v_0} \left(\frac{v_0}{2} - v_{kMT}^+ \right). \quad (4.17)$$

Raspisivanjem ovaj izraz postaje:

$$\frac{\mu_{KC}}{N_{MT}^+} v_{KC} - \frac{\mu_{KC}}{N_{MT}^+} v_{kMT}^+ = L^+ \rho_c \mu_c v_{kMT}^+ - L^+ \rho_c \mu_c \frac{v_0}{2} - D^+ \rho_m \frac{f_0}{v_0} \frac{v_0}{2} + D^+ \rho_m \frac{f_0}{v_0} v_{kMT}^+. \quad (4.18)$$

Ovdje sada uvodimo dvije pokrate:

$$g_m^\pm \equiv D^\pm \rho_m \frac{f_0}{v_0} \quad (4.19)$$

i

$$g_c^\pm \equiv L^\pm \rho_c \mu_c. \quad (4.20)$$

Množenjem izraza 4.18 s N_{MT}^+ dobivamo:

$$\mu_{KC} v_{KC} - \mu_{KC} v_{kMT}^+ = N_{MT}^+ g_m^+ v_{kMT}^+ - N_{MT}^+ g_c^+ \frac{v_0}{2} - N_{MT}^+ g_m^+ \frac{v_0}{2} + N_{MT}^+ g_m^+ v_{kMT}^+. \quad (4.21)$$

Sada grupiranjem izraza uz v_{KC} , v_{kMT}^+ i $\frac{v_0}{2}$ dobivamo sljedeći izraz:

$$v_{kMT}^+ (\mu_{KC} + N_{MT}^+ g_m^+ + N_{MT}^+ g_c^+) = \mu_{KC} v_{KC} + \frac{v_0}{2} (N_{MT}^+ g_m^+ + N_{MT}^+ g_c^+), \quad (4.22)$$

što nam daje konačan izraz za brzinu toka desnih kinetohornih mikrotubula:

$$v_{kMT}^+ = \frac{\mu_{KC} v_{KC} + \frac{v_0}{2} N_{MT}^+ (g_m^+ + g_c^+)}{\mu_{KC} + N_{MT}^+ (g_m^+ + g_c^+)}. \quad (4.23)$$

Analogno se može odrediti i izraz za brzine toka lijevih kinetohornih mikrotubula. Počnemo

od jednadžbe 4.3 za lijevu stranu:

$$F_{MT}^- = N_m^- f_m^- + N_c^- f_c^-, \quad (4.24)$$

koja upotrebom izraza 4.2, 4.4, 4.5, 4.9 i 4.10 poprima oblik:

$$-\frac{\mu_{KC}}{N_{MT}^-} (v_{KC} - v_{kMT}^-) = D^- \rho_m \frac{f_0}{v_0} (-v_0 + v_{bMT}^+ - v_{kMT}^-) - L^- \rho_c \mu_c (v_{kMT}^- - v_{bMT}^-). \quad (4.25)$$

Korištenjem izraza 4.14 i sređivanjem predznaka dobivamo:

$$\frac{\mu_{KC}}{N_{MT}^-} (v_{KC} - v_{kMT}^-) = L^- \rho_c \mu_c \left(v_{kMT}^- + \frac{v_0}{2} \right) - D^- \rho_m \frac{f_0}{v_0} \left(-\frac{v_0}{2} - v_{kMT}^- \right), \quad (4.26)$$

što se raspiše u:

$$\frac{\mu_{KC}}{N_{MT}^-} v_{KC} - \frac{\mu_{KC}}{N_{MT}^-} v_{kMT}^- = L^- \rho_c \mu_c v_{kMT}^- + L^- \rho_c \mu_c \frac{v_0}{2} + D^- \rho_m \frac{f_0}{v_0} \frac{v_0}{2} + D^- \rho_m \frac{f_0}{v_0} v_{kMT}^-. \quad (4.27)$$

Sada se cijeli izraz množi s N_{MT}^- te se primjenjuju pokrate 4.19 i 4.20:

$$\mu_{KC} v_{KC} - \mu_{KC} v_{kMT}^- = N_{MT}^- g_c^- v_{kMT}^- + N_{MT}^- g_c^- \frac{v_0}{2} + N_{MT}^- g_m^- \frac{v_0}{2} + N_{MT}^- g_m^- v_{kMT}^-. \quad (4.28)$$

Grupiranjem izraza uz v_{KC} , v_{kMT}^- i $\frac{v_0}{2}$ dobivamo:

$$v_{kMT}^- (\mu_{KC} + N_{MT}^- g_m^- + N_{MT}^- g_c^-) = \mu_{KC} v_{KC} - \frac{v_0}{2} (N_{MT}^- g_m^- + N_{MT}^- g_c^-) \quad (4.29)$$

te iz tog izraza dobivamo konačni izraz za brzine toka lijevih kinetohornih mikrotubula:

$$v_{kMT}^- = \frac{\mu_{KC} v_{KC} - \frac{v_0}{2} N_{MT}^- (g_m^- + g_c^-)}{\mu_{KC} + N_{MT}^- (g_m^- + g_c^-)}. \quad (4.30)$$

Dakle, općeniti izraz za brzine toka kinetohornih vlakana glasi:

$$v_{kMT}^\pm = \frac{\mu_{KC} v_{KC} \pm \frac{v_0}{2} N_{MT}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)}{\mu_{KC} + N_{MT}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)}. \quad (4.31)$$

Za ovaj izraz možemo uvesti još jednu pokratu kako bi se lakše koristio u daljnjim izračunima:

$$\alpha^\pm \equiv \frac{1}{\mu_{KC} + N_{MT}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)}, \quad (4.32)$$

čime izraz 4.31 postaje:

$$v_{\text{kMT}}^{\pm} = \alpha^{\pm} \left[\mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} \pm \frac{v_0}{2} N_{\text{MT}}^{\pm} (g_{\text{m}}^{\pm} + g_{\text{c}}^{\pm}) \right]. \quad (4.33)$$

Za izračunati brzinu kongresije kromosoma, koristi se jednačba 4.1 na koju prvo primjenjujemo izraze 4.2 i 4.6:

$$\xi v_{\text{KC}} = N_{\text{MT}}^{+} F_{\text{MT}}^{+} + N_{\text{MT}}^{-} F_{\text{MT}}^{-}. \quad (4.34)$$

Sljedeće raspisujemo ovu jednačbu korištenjem izraza 4.3, 4.4 i 4.5:

$$\xi v_{\text{KC}} = N_{\text{MT}}^{+} (D^{+} \rho_{\text{m}} f_{\text{m}}^{+} + L^{+} \rho_{\text{c}} f_{\text{c}}^{+}) + N_{\text{MT}}^{-} (D^{-} \rho_{\text{m}} f_{\text{m}}^{-} + L^{-} \rho_{\text{c}} f_{\text{c}}^{-}). \quad (4.35)$$

Korištenjem pokrata 4.19 i 4.20 te izraza 4.12, 4.13 i 4.14 ovu jednačbu možemo zapisati kao:

$$\begin{aligned} \xi v_{\text{KC}} &= \\ &= N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{m}}^{+} \left(\frac{v_0}{2} - v_{\text{kMT}}^{+} \right) - N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{c}}^{+} \left(v_{\text{kMT}}^{+} - \frac{v_0}{2} \right) + \\ &+ N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{m}}^{-} \left(-\frac{v_0}{2} - v_{\text{kMT}}^{-} \right) - N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{c}}^{-} \left(\frac{v_0}{2} + v_{\text{kMT}}^{-} \right), \end{aligned} \quad (4.36)$$

što se dalje raspiše u :

$$\begin{aligned} \xi v_{\text{KC}} &= \\ &= N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{m}}^{+} \frac{v_0}{2} - N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{m}}^{+} v_{\text{kMT}}^{+} - N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{c}}^{+} v_{\text{kMT}}^{+} + N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{c}}^{+} \frac{v_0}{2} - \\ &- N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{m}}^{-} \frac{v_0}{2} - N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{m}}^{-} v_{\text{kMT}}^{-} - N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{c}}^{-} \frac{v_0}{2} - N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{c}}^{-} v_{\text{kMT}}^{-}. \end{aligned} \quad (4.37)$$

Sljedeće se sortiraju članovi uz $\frac{v_0}{2}$, v_{kMT}^{+} i v_{kMT}^{-} :

$$\begin{aligned} \xi v_{\text{KC}} &= \\ &= \frac{v_0}{2} (N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{m}}^{+} + N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{c}}^{+} - N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{m}}^{-} - N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{c}}^{-}) + \\ &+ v_{\text{kMT}}^{+} (-N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{m}}^{+} - N_{\text{MT}}^{+} g_{\text{c}}^{+}) + v_{\text{kMT}}^{-} (-N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{m}}^{-} - N_{\text{MT}}^{-} g_{\text{c}}^{-}). \end{aligned} \quad (4.38)$$

Sada koristimo izraz 4.33 za raspisati v_{kMT}^+ i v_{kMT}^- :

$$\begin{aligned} \xi v_{\text{KC}} &= \\ &= \frac{v_0}{2} [N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+) - N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-)] + \\ &+ (-N_{\text{MT}}^+) (g_m^+ + g_c^+) \alpha^+ \left[\mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} + \frac{v_0}{2} N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+) \right] + \\ &+ (-N_{\text{MT}}^-) (g_m^- + g_c^-) \alpha^- \left[\mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} - \frac{v_0}{2} N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-) \right], \end{aligned} \quad (4.39)$$

što sortiranjem izraza uz $\frac{v_0}{2}$ i v_{KC} poprima oblik:

$$\begin{aligned} \xi v_{\text{KC}} &= \\ &= \frac{v_0}{2} [N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+) [1 - \alpha^+ N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+)] - N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-) [1 - \alpha^- N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-)]] - \\ &- v_{\text{KC}} [\mu_{\text{KC}} \alpha^+ N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+) + \mu_{\text{KC}} \alpha^- N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-)], \end{aligned} \quad (4.40)$$

odnosno:

$$\begin{aligned} v_{\text{KC}} [\xi + \mu_{\text{KC}} \alpha^+ N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+) + \mu_{\text{KC}} \alpha^- N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-)] &= \\ &= \frac{v_0}{2} [N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+) [1 - \alpha^+ N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+)] - N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-) [1 - \alpha^- N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-)]] . \end{aligned} \quad (4.41)$$

Ovo nas dovodi do konačnog izraza za brzinu kongresije kinetohora:

$$v_{\text{KC}} = \frac{v_0 N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+) [1 - \alpha^+ N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+)] - N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-) [1 - \alpha^- N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-)]}{\xi + \mu_{\text{KC}} [\alpha^+ N_{\text{MT}}^+ (g_m^+ + g_c^+) + \alpha^- N_{\text{MT}}^- (g_m^- + g_c^-)]}. \quad (4.42)$$

Međutim, ovaj izraz je moguće daljnje pojednostaviti raspisivanjem $1 - \alpha^\pm N_{\text{MT}}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)$:

$$\begin{aligned} 1 - \alpha^\pm N_{\text{MT}}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm) &= \\ &= 1 - \frac{N_{\text{MT}}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)}{\mu_{\text{KC}} + N_{\text{MT}}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)} = \\ &= \frac{\mu_{\text{KC}}}{\mu_{\text{KC}} + N_{\text{MT}}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)}. \end{aligned} \quad (4.43)$$

Ovdje uvodimo sljedeću pokratu:

$$\beta^\pm \equiv \frac{N_{\text{MT}}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)}{\mu_{\text{KC}} + N_{\text{MT}}^\pm (g_m^\pm + g_c^\pm)}, \quad (4.44)$$

što pojednostavi izraz 4.42 u:

$$v_{\text{KC}} = \mu_{\text{KC}} \frac{v_0}{2} \frac{\beta^+ - \beta^-}{\xi + \mu_{\text{KC}} (\beta^+ + \beta^-)}. \quad (4.45)$$

Ovaj izraz eksplicitno ovisi samo o geometriji sustava te se položaji kinetohora mogu odrediti integriranjem ovog izraza u vremenu. Nadalje, kao što će biti pojašnjeno u potpoglavlju 4.3, koeficijent trenja ξ ima veoma malenu vrijednost te je razlika u brzini kinetohora sa i bez njega samo oko 0.7%. Stoga ga je moguće ignorirati pri računanju rezultata i pojednostaviti izraz 4.45 u:

$$v_{\text{KC}} = \mu_{\text{KC}} \frac{v_0}{2} \frac{\beta^+ - \beta^-}{\mu_{\text{KC}} (\beta^+ + \beta^-)}. \quad (4.46)$$

4.3 Parametri u diobenom vretenu tijekom prometafaze

Za izračun rezultata potrebno je pažljivo odrediti vrijednosti parametara u sustavu. Iako je većina parametara slična između metafaze i prometafaze, ipak postoje neke razlike zbog kojih se ne mogu samo uzeti vrijednosti parametara dane u potpoglavlju 3.4. Parametri koji se odnose na geometriju sustava dani su u tablici 4.1, dok su u tablici 4.2 dani ostali parametri, vezani za svojstva motornih proteina, pasivnih *crosslinkera* i kinetohora

Parametar	Naziv	Iznos	Izvor
$L = L^+ + d + L^-$	Duljina diobenog vretena	16 μm	izmjereno
$D = D^+ + d + D^-$	Duljina preklopa premosnih vlakana	10 μm	izmjereno
d	Udaljenost između sestrijskih kinetohora	1 μm	izmjereno

Tablica 4.1: Geometrijski parametri u modelu.

Veličina diobenog vretena, a time i duljina preklopa, jedna je od stvari koje se razlikuju između prometafaze i metafaze. Nove vrijednosti geometrijskih parametara stoga su izmjerene mikroskopijom. Kinetohore se također razlikuju između prometafaze i metafaze te je vrijednost koeficijenta efektivnog trenja na njima uzeta kao dvostruka od one u metafazi. Koeficijent trenja kinetohore i kromosoma uveden je kao novi parametar zbog mogućeg većeg utjecaja takvog trenja u prometafazi te je njegova vrijednost preuzeta iz [8]. Međutim, pri izračunima se pokazalo da je taj parametar ipak zanemariv te na kraju nije primijenjen na rezultate pokazane

Parametar	Naziv	Iznos	Izvor
f_0	Maksimalna sila motornih proteina	5 pN	[99]
v_0	Brzina motornih proteina bez tereta	4 $\mu\text{m}/\text{min}$	procijenjeno
ρ_m	Gustoća motornih proteina	10 μm^{-1}	procijenjeno
$\rho_c \mu_c$	Produkt gustoće i koeficijenta trenja pasivnih <i>crosslinkera</i>	1 pNmin/ μm^2	procijenjeno
μ_{KC}	Koeficijent efektivnog trenja na kinetohorama	60 pNmin/ μm	procijenjeno
ξ	Koeficijent trenja kinetohore i kromosoma	1 pNmin/ μm	[8]

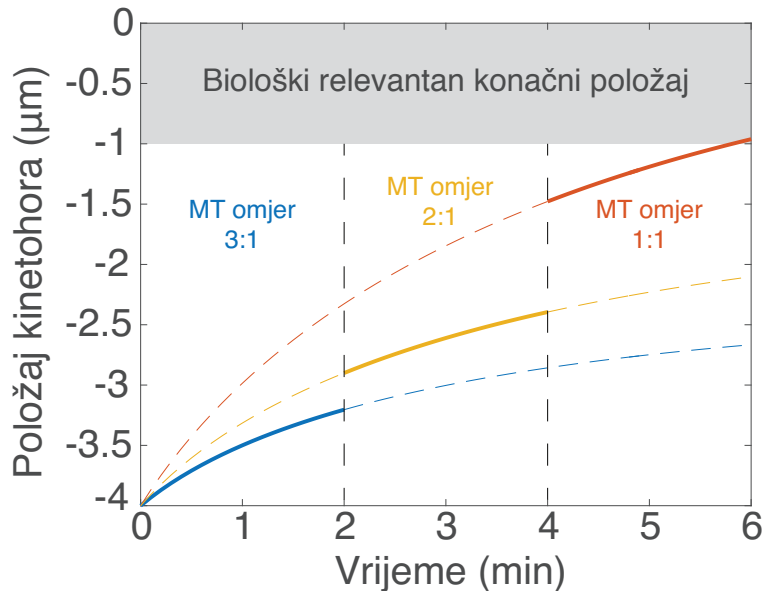
Tablica 4.2: Preostali parametri u modelu; koji se odnose na motorne proteine, pasivne *crosslinkere* i kinetohore.

u potpoglavlju 4.4. Preostali parametri ne razlikuju se previše između metafaze i prometafaze pa su njihove vrijednosti jednake kao što je dano u potpoglavlju 3.4, iz istih razloga.

4.4 Rezultati modela

Kako bi se istražila sposobnost modela da reproducira kongresiju kromosoma, kinetohore u modelu izmaknu se 4 μm lijevo od središta diobenog vretena te se omjer kinetohornih mikrotubula postavi tako da lijeva, kraća, strana ima tri puta više kinetohornih mikrotubula od desne, duže, strane. Ovi su parametri uzeti jer najbolje reproduciraju situaciju u stvarnim stanicama. Preostali parametri u modelu uzeti su kao u tablicama 4.1 i 4.2, osim ako je naznačeno drugačije. Rezultati pokazuju da se kinetohore gibaju prema središtu diobenog vretena jer jedan dugi kinetohorni mikrotubul proizvodi silu veću od tri kratka kinetohorna mikrotubula (Slika 4.2). Međutim, kinetohore ne dođu do središta diobenog vretena ako omjer kinetohornih mikrotubula ostane 3:1. Razlog tomu je što se omjer kinetohornih mikrotubula u stvarnim stanicama mijenja i izjednači kako se kromosomi približavaju metafaznoj ravnini, dok je broj kinetohornih mikrotubula u modelu fiksiran. Iz tog razloga, model se ponovno rješava za omjere 2:1 i 1:1 te se rezultati promatraju tako da se omjer kinetohornih mikrotubula mijenja svake dvije minute, što je vremenski period određen iz eksperimentalnih mjerenja. Promatranjem rezultata na taj način, vidi se da kinetohore dolaze do biološki relevantnog konačnog položaja za kongresiju, to

jest model uspješno reproducira kongresiju kromosoma.

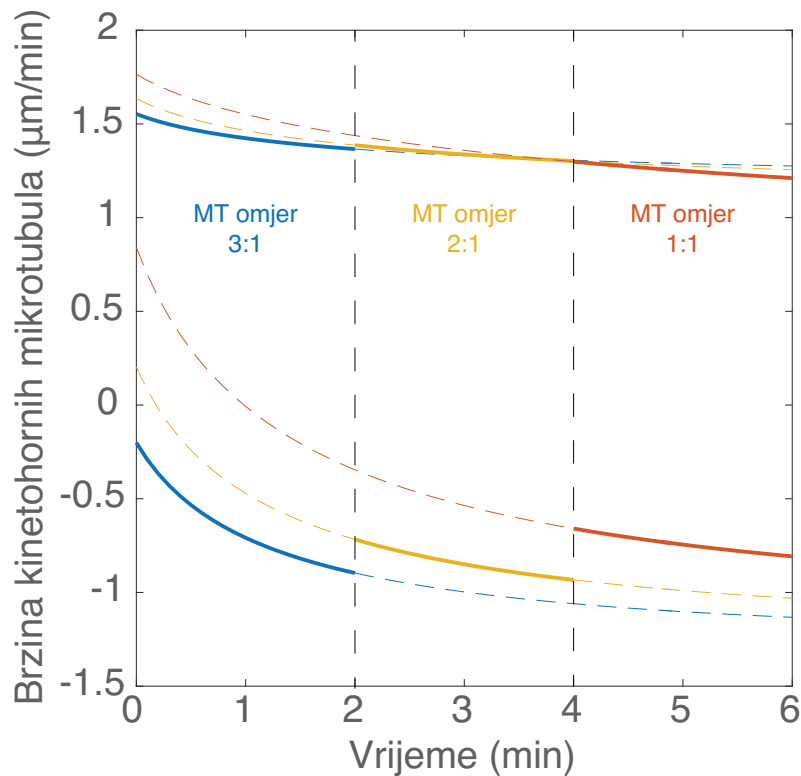


Slika 4.2: Graf ovisnosti položaja kinetohora o vremenu. Linije različitih boja predstavljaju slučajeve s različitim omjerima broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Plava linija predstavlja omjer 3:1, žuta linija omjer 2:1, a crvena linija omjer 1:1. Podebljani dio linije označava da je taj omjer relevantan za vremenski period u kojem se nalazi. Sivom je bojom označeno područje konačnih položaja kinetohora za koje je kongresija uspješna.

Sljedeće promatramo brzine toka kinetohornih vlakana s lijeve i desne strane kinetohora (Slika 4.3). Početno dulji kinetohorni mikrotubuli s desne strane kinetohore se skraćuju i njihov tok usporava kako se kinetohore približavaju središtu diobenog vretena. Suprotno tome, početno kraći kinetohorni mikrotubuli s lijeve strane produljuju se i njihov tok ubrzava kako se kinetohore približavaju središtu diobenog vretena.

Kako bi se detaljnije ustvrdilo ponašanje modela pri promjeni omjera broja kinetohornih mikrotubula, promatraju se brzina centriranja kinetohora i razlika brzine toka kinetohornih vlakana u ovisnosti o omjeru broja kinetohornih mikrotubula (Slika 4.4). Rezultati pokazuju da se brzine smanjuju s povećanjem omjera, odnosno broja kinetohornih mikrotubula na kraćoj strani. Također, za dovoljno velik broj kinetohornih mikrotubula na kraćoj strani sila s te strane postaje dovoljno velika da nadjača silu dužeg kinetohornog mikrotubula i to uzrokuje gibanje kinetohora prema polu umjesto središtu diobenog vretena, što nazivamo antikongresija.

Promatra se i ovisnost konačnog položaja kinetohora o omjeru broja kinetohornih mikrotubula (Slika 4.5). Kao što je i očekivano, kinetohore završe na središtu diobenog vretena samo za omjer 1:1 te se konačni položaj sve više udaljava od središta kako omjer broja kinetohornih



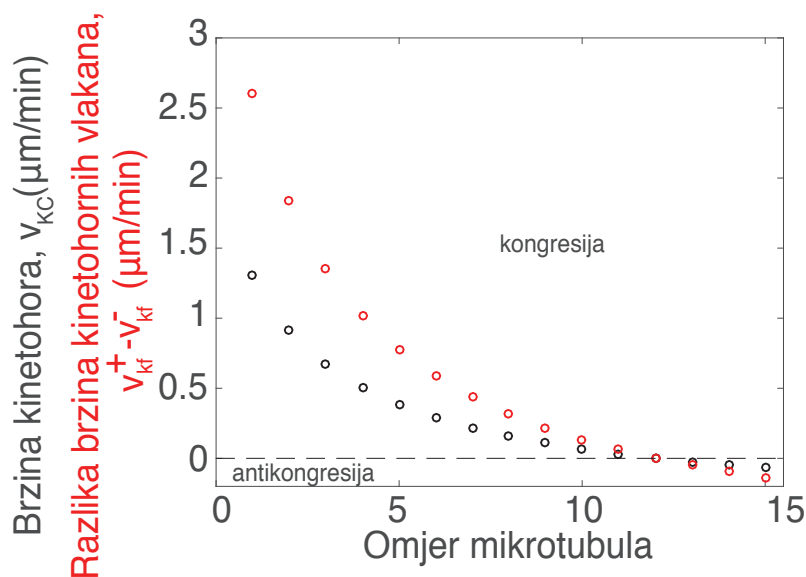
Slika 4.3: Graf ovisnosti brzina kraćih kinetohornih mikrotubula (dolje) i dužih kinetohornih mikrotubula (gore) o vremenu. Linije različitih boja predstavljaju slučajeve s različitim omjerima broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Plave linije predstavljaju omjer 3:1, žute linije omjer 2:1, a crvene linije omjer 1:1. Podebljani dio linije označava da je taj omjer relevantan za vremenski period u kojem se nalazi.

mikrotubula raste.

Sljedeće proučavamo sile koje djeluju u modelu. Prvo promatramo silu kojom mikrotubuli djeluju na kinetohore s kraće strane, koja se suprotstavlja kongresiji kromosoma (Slika 4.6). Ova sila raste s brzinom toka kraćih kinetohornih vlakana kako se kinetohore približavaju središtu diobenog vretena te se brzina centriranja kinetohora smanjuje.

S obzirom da smo u izračunima zanemarili koeficijent trenja ξ , sila kojom mikrotubuli djeluju na kinetohore s duže strane mora biti jednaka onoj s kraće strane, prema jednadžbi 4.1. Rezultati potvrđuju ovu tvrdnju i pokazuju da su te dvije sile zaista jednake (Slika 4.7). Sila kojom mikrotubuli djeluju na kinetohore s duže strane također raste kako se kinetohore približavaju središtu diobenog vretena, zbog promjene u razlici između brzine centriranja kinetohora i brzine toka dužeg kinetohornog mikrotubula.

Sljedeće promatramo ukupne sile pasivnih *crosslinkera* i motornih proteina s kraće strane. Ove se dvije sile zbrajaju u silu kojom mikrotubuli djeluju na kinetohore, prema jednadžbi 4.2.

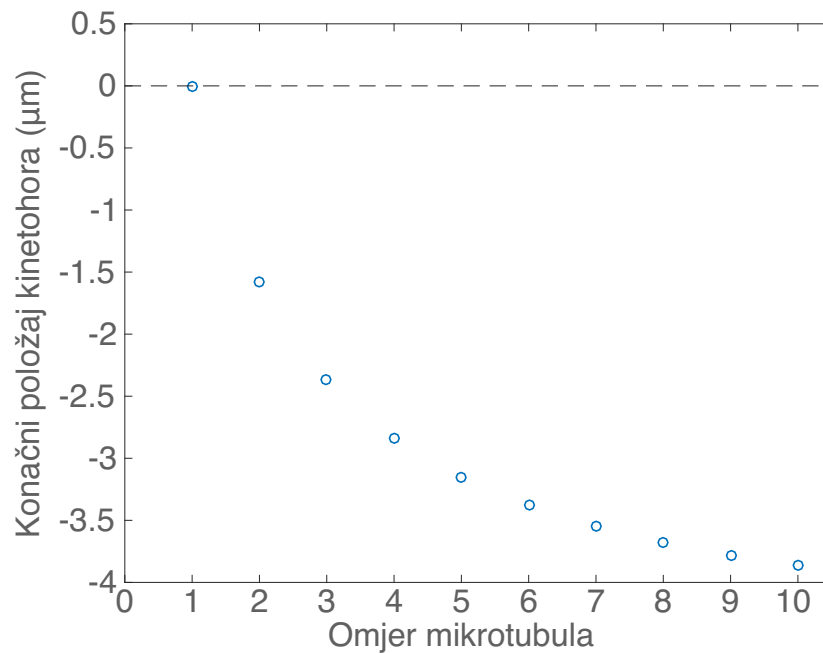


Slika 4.4: Brzina kinetohora i razlika u brzini toka dužih i kraćih kinetohornih vlakana u početnom položaju u ovisnosti o omjeru broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Iscrtkana linija označava slučaj za koji su brzine nula i predstavlja granicu između kongresije (gibanja prema središtu diobenog vretena) i antikongresije (gibanja prema bližem polu).

Ukupna sila pasivnih *crosslinkera* najveća je za slučaj s najviše mikrotubula na kraćoj strani jer taj slučaj daje najveći ukupni paralelni preklop kinetohornih i premosnih mikrotubula (Slika 4.8). Ukupna sila motornih proteina mnogo je veća od one pasivnih *crosslinkera* te ona daje najveći doprinos sili kojom mikrotubuli djeluju na kinetohore (Slika 4.9). Ova je sila također najveća za slučaj s najviše mikrotubula na kraćoj strani jer taj slučaj daje i najveći ukupni antiparalelni preklop kinetohornih i premosnih mikrotubula. Sila pasivnih *crosslinkera* opada kako se kinetohore približavaju središtu diobenog vretena, a sila motornih proteina raste.

Ukupne sile pasivnih *crosslinkera* i motornih proteina s duže strane pokazuju slično ponašanje kao i one s kraće strane (Slike 4.10 i 4.11). Sile se zbrajaju u silu kojom mikrotubuli djeluju na kinetohore te su najveće za slučaj s najviše mikrotubula na kraćoj strani. U ovom slučaju to nije zbog razlika u duljini paralelnih i antiparalelnih preklopa, već zbog promjena u razlici brzine toka kinetohornih i premosnih vlakana. Za dulju stranu obje sile opadaju kako se kinetohore približavaju središtu diobenog vretena. Ukupna sila motornih proteina na duljoj strani veća je od one na kraćoj strani, dok je ukupna sila pasivnih *crosslinkera* na duljoj strani manja od one na kraćoj strani.

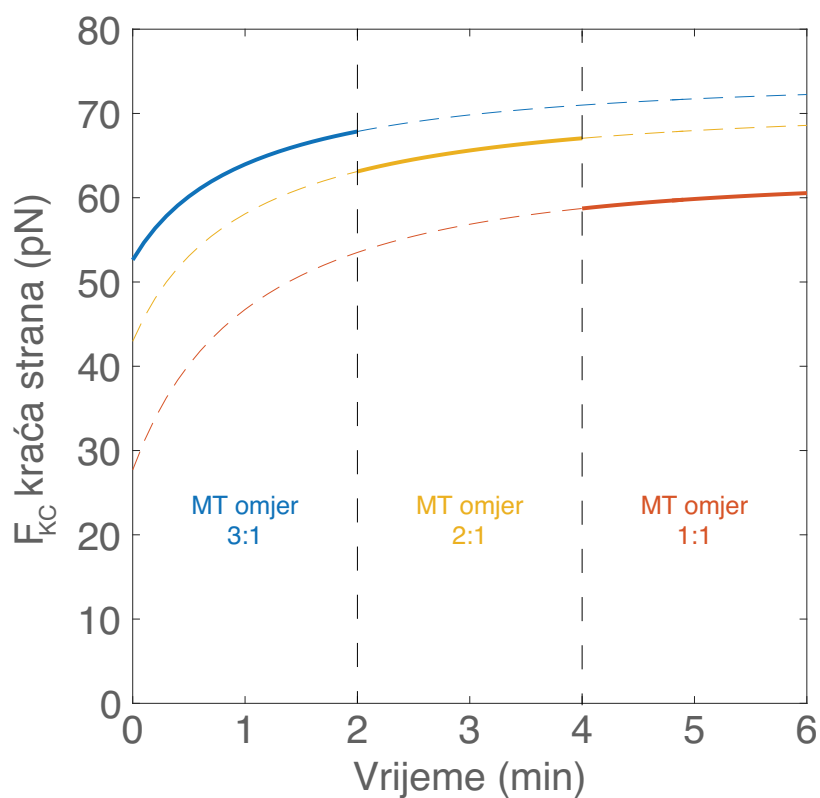
Ovi rezultati pokazuju da model centriranja vođenog tokom mikrotubula uspješno repro-



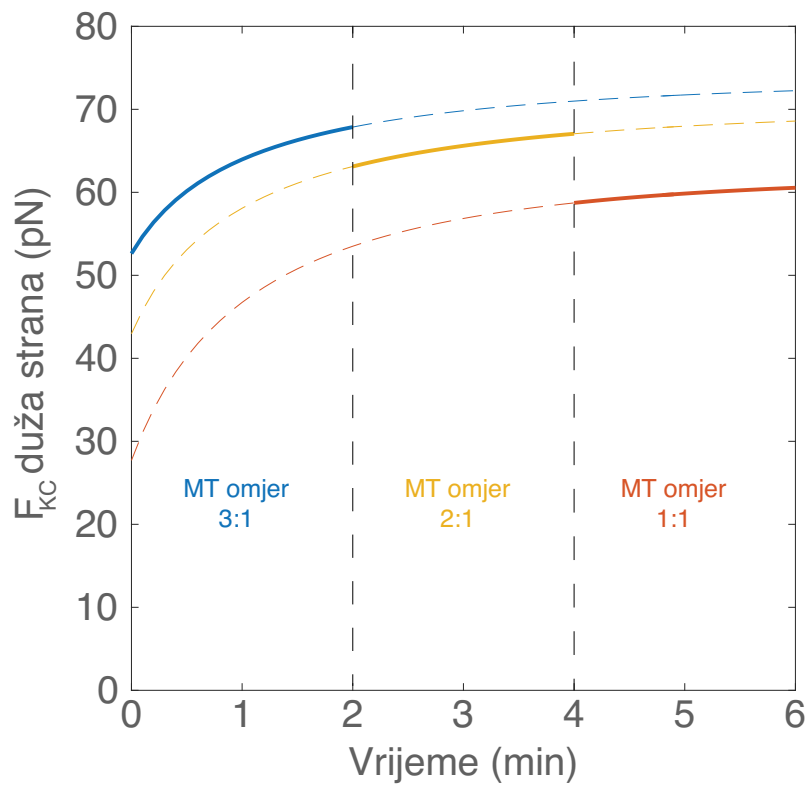
Slika 4.5: Konačni položaj kinetohora u ovisnosti o omjeru broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Iscrtkana linija označava središte diobenog vretena.

ducira kongresiju kromosoma u prometafazi, sve dok se uzme u obzir činjenica da se broj kinetohornih mikrotubula s lijeve i desne strane izjednačava kako kinetohore prilaze središtu diobenog vretena. Model daje ključno predviđanje da manji broj duljih kinetohornih mikrotubula generira veću silu od većeg broja kraćih kinetohornih mikrotubula te tako omogućuje gibanje kromosoma prema središtu diobenog vretena, odnosno kongresiju. Model također predviđa da za dovoljno velik broj kraćih kinetohornih mikrotubula to više neće biti slučaj te će se kromosomi umjesto središta diobenog vretena gibati prema bližem polu. To predviđanje može objasniti slučajeve u stvarnim stanicama gdje neki kromosomi ostanu u blizini pola i ne kongresiraju.

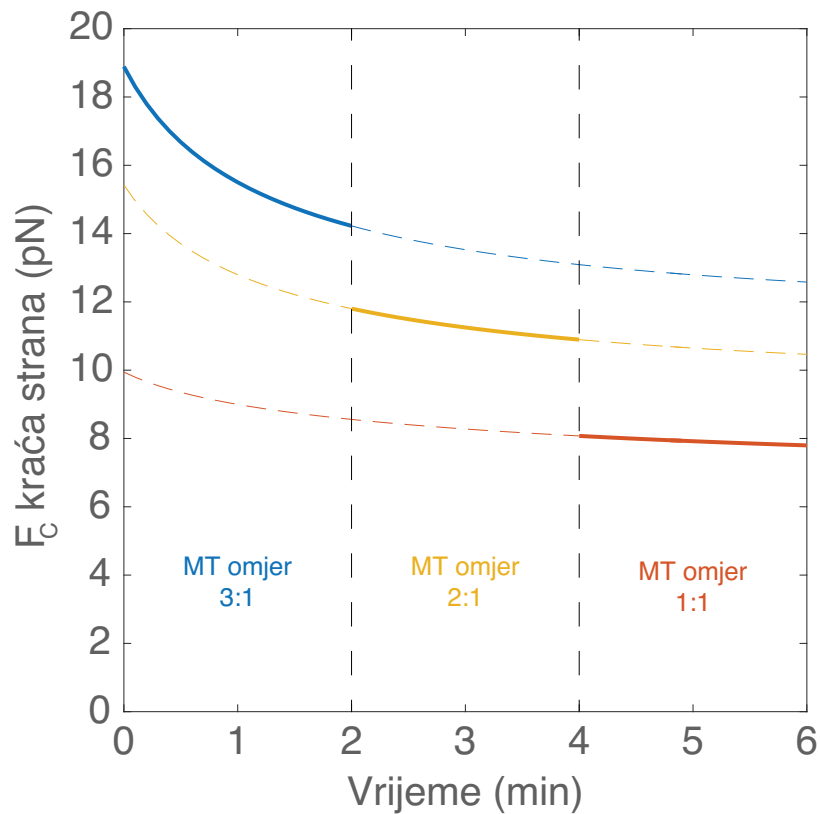
Sve u svemu, predstavljeni modeli i njihovi rezultati pokazuju da je razlika u *poleward fluxu* sestrinskih kinetohornih vlakana ključan mehanizam pri kongresiji kromosoma tijekom prometafaze i njihovom centriranju u metafazi te se daljnjim proučavanjem tog mehanizma može steći bolji uvid u procese koji osiguravaju ispravnu diobu stanica, kao i u one koji ometaju ispravno provođenje mitoze i time uzrokuju brojne poremećaje.



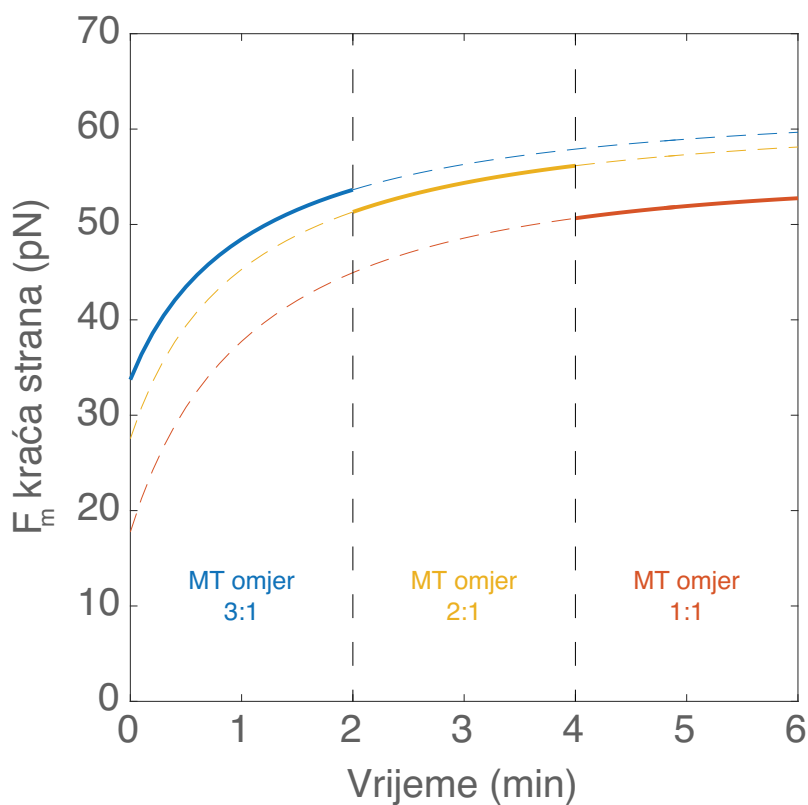
Slika 4.6: Sila kojom mikrotubuli djeluju na kinetohore u ovisnosti o vremenu za stranu s kraćim mikrotubulima. Linije različitih boja predstavljaju slučajeve s različitim omjerima broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Plava linija predstavlja omjer 3:1, žuta linija omjer 2:1, a crvena linija omjer 1:1. Podebljani dio linije označava da je taj omjer relevantan za vremenski period u kojem se nalazi.



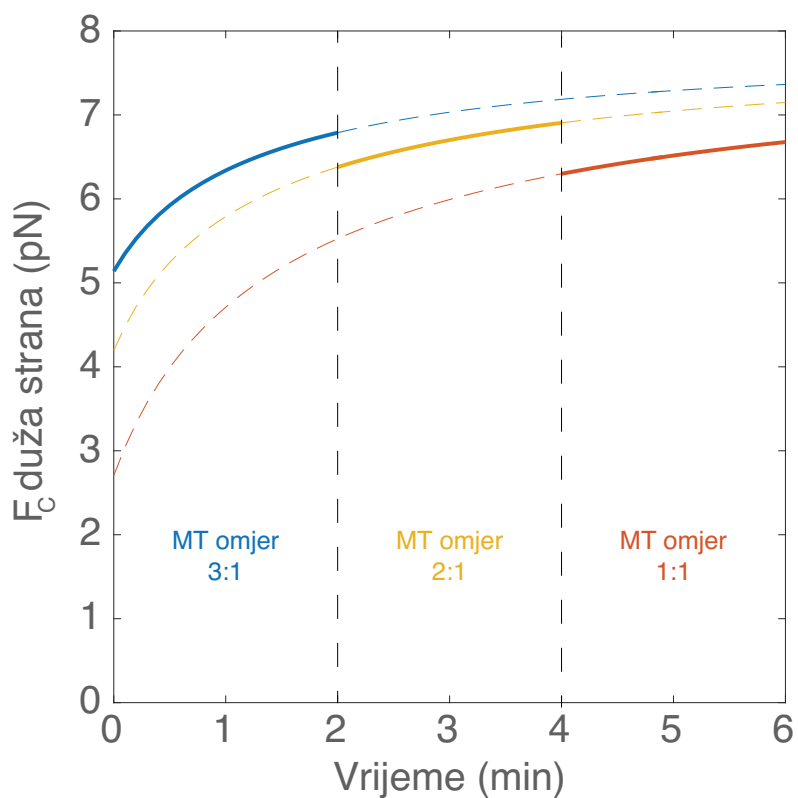
Slika 4.7: Sila kojom mikrotubuli djeluju na kinetohore u ovisnosti o vremenu za stranu s dužim mikrotubulima. Linije različitih boja predstavljaju slučajeve s različitim omjerima broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Plava linija predstavlja omjer 3:1, žuta linija omjer 2:1, a crvena linija omjer 1:1. Podebljani dio linije označava da je taj omjer relevantan za vremenski period u kojem se nalazi.



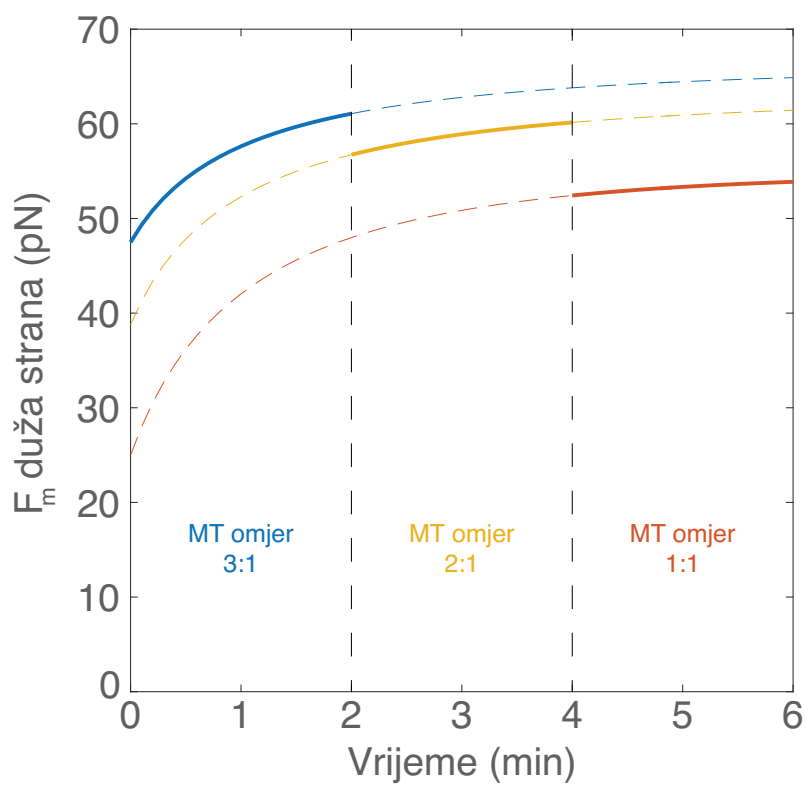
Slika 4.8: Ukupna sila pasivnih *crosslinkera* na kraće mikrotubule u ovisnosti o vremenu. Linije različitih boja predstavljaju slučajeve s različitim omjerima broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Plava linija predstavlja omjer 3:1, žuta linija omjer 2:1, a crvena linija omjer 1:1. Podebljani dio linije označava da je taj omjer relevantan za vremenski period u kojem se nalazi.



Slika 4.9: Ukupna sila motornih proteina na kraće mikrotubule u ovisnosti o vremenu. Linije različitih boja predstavljaju slučajeve s različitim omjerima broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Plava linija predstavlja omjer 3:1, žuta linija omjer 2:1, a crvena linija omjer 1:1. Podebljani dio linije označava da je taj omjer relevantan za vremenski period u kojem se nalazi.



Slika 4.10: Ukupna sila pasivnih *crosslinkera* na duže mikrotubule u ovisnosti o vremenu. Linije različitih boja predstavljaju slučajeve s različitim omjerima broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Plava linija predstavlja omjer 3:1, žuta linija omjer 2:1, a crvena linija omjer 1:1. Podebljani dio linije označava da je taj omjer relevantan za vremenski period u kojem se nalazi.



Slika 4.11: Ukupna sila motornih proteina na duže mikrotubule u ovisnosti o vremenu. Linije različitih boja predstavljaju slučajeve s različitim omjerima broja kinetohornih mikrotubula na strani s kraćim mikrotubulima i na strani s dužim mikrotubulima. Plava linija predstavlja omjer 3:1, žuta linija omjer 2:1, a crvena linija omjer 1:1. Podebljani dio linije označava da je taj omjer relevantan za vremenski period u kojem se nalazi.

Poglavlje 5

Diskusija i zaključak

U ovom radu predstavljen je model centriranja kromosoma u diobenom vretenu tijekom mitoze pomoću toka mikrotubula usmjerenog prema polu. Model se zasniva na silama generiranim od strane proteina koji se nakupljaju u paralelnim i antiparalelnim preklopima kinetohornih i premosnih mikrotubula [84]. Ovaj model u potpunosti je konceptualno nezavisan od već postojećih modela za centriranje kromosoma, kao što su suzbijanje dinamike kinetohornih vlakana putem katastrofe mikrotubula ovisne o njihovoj duljini [26, 28, 49, 59] ili sile izbacivanja s pola [4, 12, 13, 42]. To ne isključuje mogućnost da ovi mehanizmi djeluju zajedno u stanici s različitom učinkovitosti ovisno o vrsti stanice i stadiju diobenog vretena. Diobeno je vreteno kompleksno te je teško eksperimentalno odrediti doprinos različitih mehanizama [75]. Međutim, buduća teorijska istraživanja koja bi uključivala regulaciju plus krajeva mikrotubula, nukleaciju mikrotubula na postojećim mikrotubulima te sile izbacivanja s pola mogla bi pomoći u identificiranju uloge svakog pojedinog mehanizma.

Model centriranja kromosoma u diobenom vretenu tijekom mitoze pomoću toka mikrotubula usmjerenog prema polu primijenjen je na dva slučaja: centriranje kromosoma u metafazi i kongresiju kromosoma u prometafazi. Model za centriranje kromosoma u metafazi sastoji se od jednog para sestrinskih kinetohora izmaknutih iz središta diobenog vretena. Na svaku od sestrinskih kinetohora zakvačeno je po jedno kinetohorno vlakno, a po jedno premosno vlakno proteže se od ruba diobenog vretena prema suprotnoj strani. Kinetohorna i premosna vlakna stvaraju antiparalelne i paralelne preklope u kojima se akumuliraju motorni proteini i pasivni *crosslinkeri* te generiraju sile koje vode tok kinetohornih i premosnih vlakana prema polu. Rezultati modela za metafazu pokazuju da kinetohore dolaze do središta diobenog vretena unutar nekoliko minuta te model uspješno reproducira centriranje kromosoma u metafazi. Model također daje ključna i jedinstvena predviđanja - da je tok kinetohornih vlakana uvijek sporiji od toka premosnih vlakana i da duže kinetohorno vlakno ima brži tok od kraćeg.

Model za kongresiju kromosoma u prometafazi uvodi ključnu modifikaciju u odnosu na prethodni model, a to je da se broj kinetohornih mikrotubula na lijevoj i desnoj kinetohori razlikuje. Na strani bližoj polu nalazi se veći broj kraćih kinetohornih mikrotubula, dok je na suprotnoj strani jedan dulji kinetohorni mikrotubul. Rezultati ovog modela pokazuju da će manji broj duljih kinetohornih mikrotubula nadjačati veći broj kraćih kinetohornih mikrotubula te se kinetohore gibaju prema središtu diobenog vretena. Ako se uzme u obzir činjenica da će se broj kinetohornih mikrotubula s obje strane izjednačavati kako kinetohore prilaze središtu diobenog vretena, kinetohore u modelu dolaze do biološki relevantnog konačnog položaja za kongresiju te model uspješno reproducira kongresiju kromosoma u prometafazi. Ovaj model pokazuje i da će se za dovoljno velik broj kinetohornih mikrotubula s kraće strane kinetohore gibati prema bližem polu umjesto prema središtu diobenog vretena, što može objasniti stvarne slučajeve u kojima kinetohore ostaju u blizini polova i ne kongresiraju.

Predstavljeni model uspješno reproducira i centriranje kromosoma u metafazi i kongresiju kromosoma u prometafazi. U budućnosti moguće ga je daljnje unaprijediti uzimanjem više faktora u obzir, koji su u trenutnom modelu izostavljeni radi jednostavnosti. Mikrotubuli su modelirani tako da je stopa njihove polimerizacije i depolimerzacije na plus krajevima jednaka te se stoga mogu smatrati statičkima. To znači da model ne uključuje dinamičku nestabilnost mikrotubula, koja je prisutna u stvarnim stanicama. Dinamički model mogao bi prikazati tu nestabilnost mikrotubula, kao i modelirati nukleaciju mikrotubula ne samo na polovima, već i duž već postojećih mikrotubula. Na taj način bi se broj mikrotubula u modelu također mogao mijenjati u vremenu. Još jedno moguće unaprijeđenje jest uzimanje u obzir i interakcija minus krajeva mikrotubula s polovima diobenog vretena jer je poznato da na polovima postoje mehanizmi koji mogu utjecati na gibanje kromosoma tijekom mitoze.

Sve u svemu, model centriranja kromosoma u diobenom vretenu tijekom mitoze pomoću toka mikrotubula usmjerenog prema polu pokazuje da je razlika u toku sestrinskih kinetohornih vlakana ključan mehanizam i za kongresiju kromosoma u prometafazi i za njihovo centriranje u metafazi. Ovaj rad pokazuje da taj mehanizam koji nije prethodno proučavan može, neovisno o drugim i prethodno poznatim mehanizmima, utjecati na centriranje kromosoma u diobenom vretenu tijekom mitoze te se proučavanjem njega može steći uvid u procese koji osiguravaju ispravnu diobu stanica, kao i u procese koji ometaju ispravno provođenje mitoze i time uzrokuju razne bolesti i poremećaje.

Reference

1. Aist, J., Liang, H. & Berns, M. Astral and spindle forces in PtK2 cells during anaphase B: a laser microbeam study. *J Cell Sci* **104**, 1207–1216. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8314902/> (1993).
2. Akiyoshi, B. *et al.* Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* **468**, 576–579. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21107429/> (2010).
3. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell Fifth Edition* ISBN: 9780815341055 (Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008).
4. Armond, J., Harry, E., McAinsh, A. & Burroughs, N. Inferring the Forces Controlling Metaphase Kinetochore Oscillations by Reverse Engineering System Dynamics. *PLoS Comput Biol* **11**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4664287/> (2015).
5. Bajer, A. Functional autonomy of monopolar spindle and evidence for oscillatory movement in mitosis. *J Cell Biol* **93**, 33–48. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2112119/> (1982).
6. Bajer, A. & Mole-Bajer, J. *Spindle Dynamics and Chromosome Movements* ISBN: 9780123643636 (Academic Press, 1972).
7. Barišić, M., Aguiar, P., Geley, S. & Maiato, H. Kinetochore motors drive congression of peripheral polar chromosomes by overcoming random arm-ejection forces. *Nat Cell Biol* **16**, 1249–1256. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25383660/> (2014).
8. Betterton, M. & McIntosh, J. Regulation of chromosome speeds in mitosis. *Cell Mol Bioeng* **6**, 418–430. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26405462/> (2013).
9. Bieling, P., Telley, I. & Surrey, T. A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell* **142**, 420–432. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20691901/> (2010).

10. Braun, M. *et al.* Adaptive braking by Ase1 prevents overlapping microtubules from sliding completely apart. *Nat Cell Biol* **13**, 1259–1264. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21892183/> (2011).
11. Brust-Mascher, I., Sommi, P., Cheerambathur, D. & Scholey, J. Kinesin-5-dependent poleward flux and spindle length control in *Drosophila* embryo mitosis. *Mol Biol Cell* **20**, 1749–1762. <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e08-10-1033> (2009).
12. Civelekoglu-Scholey, G., Sharp, D., Mogilner, A. & Scholey, J. Model of chromosome motility in *Drosophila* embryos: adaptation of a general mechanism for rapid mitosis. *Biophys J* **90**, 3966–3982. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16533843/> (2006).
13. Civelekoglu-Scholey, G. *et al.* Dynamic bonds and polar ejection force distribution explain kinetochore oscillations in PtK1 cells. *J Cell Biol* **201**, 577–593. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23671311/> (2013).
14. Cojoc, G. *et al.* Laser microsurgery reveals conserved viscoelastic behavior of the kinetochore. *J Cell Biol* **212**, 767–776. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27002163/> (2016).
15. Cooper, G. & R.E., H. *Stanica: Molekularni pristup peto izdanje* ISBN: 9789531764933 (Medicinska naklada, Zagreb, 2010).
16. Coue, M., Lombillo, V. & McIntosh, J. Microtubule depolymerization promotes particle and chromosome movement in vitro. *J Cell Biol* **112**, 1165–1175. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1999468/> (1991).
17. Desai, A. & Mitchison, T. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83–117. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9442869/> (1997).
18. Dick, A. & Gerlich, D. Kinetic framework of spindle assembly checkpoint signalling. *Nature Cell Biology* **15**, 1370–1377. <https://www.nature.com/articles/ncb2842> (2013).
19. Dogterom, M. & Yurke, B. Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science* **278**, 856–860. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9346483/> (1997).
20. Dumont, S. & Mitchison, T. Compression regulates mitotic spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr Biol* **19**, 1086–1095. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19540117/> (2009).

21. Elting, M., Huechen, C., Udy, D. & Dumont, S. Force on spindle microtubule minus ends moves chromosomes. *J Cell Biol* **206**, 245–256. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25023517/> (2014).
22. Fonseca, C. *et al.* Mitotic chromosome alignment ensures mitotic fidelity by promoting interchromosomal compaction during anaphase. *Journal of Cell Biology* **218**, 1148–1163. <https://rupress.org/jcb/article/218/4/1148/61876/Mitotic-chromosome-alignment-ensures-mitotic> (2019).
23. Forer, A. Local reduction of spindle fiber birefringence in living *Nephrotoma Suturalis* (Loew) spermatocytes induced by ultraviolet microbeam irradiation. *J Cell Biol* **25**, 95–117. <https://rupress.org/jcb/article/25/1/95/16590/LOCAL-REDUCTION-OF-SPINDLE-FIBER-BIREFRINGENCE-IN> (1965).
24. Ganem, N., Upton, K. & Compton, D. Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux. *Curr Biol* **15**, 1827–1832. [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(05\)01035-3](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(05)01035-3) (2005).
25. Garcia, M., Koonruga, N. & Toda, T. 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. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11967147/> (2002).
26. Gardner, M. *et al.* Chromosome congression by Kinesin-5 motor-mediated disassembly of longer kinetochore microtubules. *Cell* **135**, 894–906. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19041752/> (2008).
27. Garzon-Coral, C., Fantana, H. & Howard, J. A force-generating machinery maintains the spindle at the cell center during mitosis. *Science* **352**, 1124–1127. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27230381/> (2016).
28. Geregely, Z., Crapo, A., Hough, L., McIntosh, J. & Betterton, M. Kinesin-8 effects on mitotic microtubule dynamics contribute to spindle function in fission yeast. *Mol Biol Cell* **27**, 3490–3514. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5221583/> (2016).
29. Gilchrist, D. A. *Mitosis* <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mitosis>.
30. Gomes, A. M. *et al.* Micronuclei from misaligned chromosomes that satisfy the spindle assembly checkpoint in cancer cells. *Current Biology* **32**, 4240–4254. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36057259/> (2022).

31. Grishchuk, E., Molodstov, M., Ataullakhanov, F. & McIntosh, J. Force production by disassembling microtubules. *Nature* **438**, 384–388. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16292315/> (2005).
32. Hagan, I. & Yanagida, M. Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7+* gene. *Nature* **347**, 563–566. <https://www.nature.com/articles/347563a0> (1990).
33. Hamaguchi, Y., Toriyama, M., Sakai, H. & Hiramoto, Y. Redistribution of Fluorescently Labeled Tubulin in the Mitotic Apparatus of Sand Dollar Eggs and the Effects of Taxol. *Cell Struct Funct* **12**, 43–52. https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf1975/12/1/12_1_43/_article (1987).
34. Hentrich, C. & Surrey, T. Microtubule organization by the antagonistic mitotic motors kinesin-5 and kinesin-14. *J Cell Biol* **189**, 465–480. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20439998/> (2010).
35. Hiramoto, Y. & Izutsu, K. Poleward movement of "markers" existing in mitotic spindles of grasshopper spermatocytes. *Cell Struct Funct* **2**, 257–259. https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf1975/2/3/2_3_257/_article (1977).
36. Hiramoto, Y. & Izutsu, K. The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J Cell Biol* **167**, 813–818. <https://rupress.org/jcb/article/167/5/813/34121/The-kinesin-Eg5-drives-poleward-microtubule-flux> (2004).
37. Iemura, K., Natsume, T., Maehara, K., Kanemaki, M. T. & Tanaka, K. Chromosome oscillation promotes Aurora A-dependent Hec1 phosphorylation and mitotic fidelity. *Journal of Cell Biology* **220**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33988677/> (2021).
38. Inoue, S. The effect of colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle. *Exp Cell Res* **2**, 305–318. https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789812790866_0011 (1952).
39. Itabashi, T. *et al.* Mechanical impulses can control metaphase progression in a mammalian cell. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 7320–7325. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22523237/> (2012).
40. Jagrić, M., Risteski, P., Martinčić, J., Milas, A. & Tolić, I. Optogenetic control of PRC1 reveals its role in chromosome alignment on the spindle by overlap length-dependent forces. *Elife* **10**. <https://elifesciences.org/articles/61170> (2021).

41. Jiang, W. *et al.* PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol Cell* **2**, 877–885. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9885575/> (1998).
42. Joglekar, A. & Hunt, A. A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements. *Biophys J* **83**, 42–58. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12080099/> (2002).
43. Kajtez, J. *et al.* Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores. *Nature Communications* **7**. <https://www.nature.com/articles/ncomms10298> (2016).
44. Ke, K., Cheng, J. & Hunt, A. The Distribution of Polar Ejection Forces Determines the Amplitude of Chromosome Directional Instability. *Curr Biol* **19**, 807–815. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2712573/> (2009).
45. Khodjakov, A., Cole, R. & Oakley B.R. Rieder, C. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol* **10**, 59–67. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10662665/> (2000).
46. Khodjakov, A. & Rieder, C. Kinetochores moving away from their associated pole do not exert a significant pushing force on the chromosome. *J Cell Biol* **135**, 315–327. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8896591/> (1996).
47. Kiewisz, R. *et al.* Three-dimensional structure of kinetochore-fibers in human mitotic spindles. *Elife* **11**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35894209/> (2022).
48. Klaasen, S. J. *et al.* Nuclear chromosome locations dictate segregation error frequencies. *Nature* **607**, 604–609. <https://www.nature.com/articles/s41586-022-04938-0/> (2022).
49. Klemm, A., Bosilj, A., Glunčić, M., Pavin, N. & Tolić, I. Metaphase kinetochore movements are regulated by kinesin-8 motors and microtubule dynamic instability. *Mol Biol Cell* **29**, 1332–1345. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29851559/> (2018).
50. Kline-Smith, S. & Walczak, C. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Mol Cell* **15**, 317–327. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15304213/> (2004).
51. Knouse, K., Davoli, T., Ellegde, S. & Amon, A. Aneuploidy in Cancer: Seq-ing Answers to Old Questions. *Annual Review of Cancer Biology* **1**. https://www.researchgate.net/publication/310755995_Aneuploidy_in_Cancer_Seq-ing_Answers_to_Old_Questions (2017).

52. Koshland, D., Mitchison, T. & Kirschner, M. Polewards chromosome movement driven by microtubule depolymerization in vitro. *Nature* **331**, 499–504. <https://www.nature.com/articles/331499a0> (1988).
53. Lansky, Z. *et al.* Diffusible crosslinkers generate directed forces in microtubule networks. *Cell* **160**, 1159–1168. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25748652/> (2015).
54. Lodish, H. *et al.* *Molecular Cell Biology Sixth Edition* ISBN: 9781429203142 (W. H. Freeman and Company, 2008).
55. Lombillo, V., Stewart, R. & McIntosh, J. Minus-end-directed motion of kinesin-coated microspheres driven by microtubule depolymerization. *Nature* **373**, 161–164. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7816099/> (1995).
56. Magidson, V. *et al.* The Spatial Arrangement of Chromosomes during Prometaphase Facilitates Spindle Assembly. *Cell* **146**, 555–567. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21854981/> (2011).
57. Maiato, H., Gomes, A., Sousa, F. & Barisic, M. Mechanisms of Chromosome Congression during Mitosis. *Biology* **6**, 13–69. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28218637/> (2017).
58. Maiato, H., Rieder, C. & Khodjakov, A. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J Cell Biol* **167**, 831–840. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15569709/> (2004).
59. Mary, H. *et al.* Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations. *J Cell Sci* **128**, 3720–3730. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4631777/> (2015).
60. Matos, I. *et al.* Synchronizing chromosome segregation by flux-dependent force equalization at kinetochores. *J Cell Biol* **186**, 11–26. <https://rupress.org/jcb/article/186/1/11/35411/Synchronizing-chromosome-segregation-by-flux> (2009).
61. Mayr, M. *et al.* The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr Biol* **17**, 488–498. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17346968/> (2007).
62. McIntosh, J., Molodtsov, M. & Ataullakhanov, F. Biophysics of Mitosis. *Q Rev Biophys* **45**, 147–207. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22321376> (2012).
63. McNeill, P. & Berns, M. Chromosome behavior after laser microirradiation of a single kinetochore in mitotic PtK2 cells. *J Cell Biol* **88**, 543–553. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7194343/> (1981).

64. Mitchison, T., Evans, L., Schulze, E. & Kirschner, M. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell* **45**, 515–527. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3708686/> (1986).
65. Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6504138/> (1984).
66. Mitchison, T. Mechanism and function of poleward flux in *Xenopus* extract meiotic spindles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 623–629. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2004.1616> (2005).
67. Mitchison, T. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J Cell Biol* **109**, 637–652. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2760109/> (1989).
68. Mole-Bajer, J., Bajer, A. & Owczarzak, A. Chromosome movements in prometaphase and aster transport in the newt. *Cytobios* **13**, 45–65. <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL7650273242> (1975).
69. Mollinari, C. *et al.* PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* **157**, 1175–1186. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12082078/> (2002).
70. Mussachio, A. & Desai, A. A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function. *Biology* **6**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28125021/> (2017).
71. Nicklas, R. Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *J Cell Biol* **97**, 542–548. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2112533/> (1983).
72. Nicklas, R. & Staehly, C. Chromosome micromanipulation. I. The mechanics of chromosome attachment to the spindle. *Chromosoma* **21**, 1–16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5339860/> (1967).
73. O'Connor, C. *Cell Division: Stages of Mitosis* <https://www.nature.com/scitable/topicpage/mitosis-and-cell-division-205/>.
74. Ohi, R., Coughlin, M., Lane, W. & Mitchison, T. An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a KinI kinesin. *Dev Cell* **5**, 309–321. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12919681/> (2003).
75. Pavin, N. & Tolić, I. Mechanobiology of the Mitotic Spindle. *Dev Cell* **56**, 192–201. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33238148/> (2021).

76. Pavin, N. & Tolić, I. Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle. *Annu.Rev.Biophys.* **45**, 279–298. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27145873/> (2016).
77. Pellman, D., Bagget, M., Tu, Y., Fink, G. & Tu, H. Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **130**, 1373–1385. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7559759/> (1995).
78. Pickett-Heaps, J., Tippit, D. & Porter, K. Rethinking mitosis. *Cell* **29**, 729–744. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6217897/> (1982).
79. Rath, O. & Kozielski, F. Kinesins and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 527–539. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22825217/> (2012).
80. Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A. & Sluder, G. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *Journal of Cell Biology* **130**, 941–948. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7642709/> (1995).
81. Rieder, C. The structure of the cold-stable kinetochore fiber in metaphase PtK1 cells. *Chromosoma* **84**, 145–158. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7297248/> (1981).
82. Rieder, C., Davison, E., Jensen, L., Cassimeris, L. & Salmon, E. Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. *J Cell Biol* **103**, 581–591. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3733881/> (1986).
83. Rieder, C. & Salmon, E. Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J Cell Biol* **124**, 223–233. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8294508/> (1994).
84. Risteski, P. *et al.* Length-dependent poleward flux of sister kinetochore fibers promotes chromosome alignment. *Cell Reports* **40**. <https://www.cell.com/cell-reports/issue?pii=S2211-1247%2821%29X0032-0> (2022).
85. Rogers, G. *et al.* Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* **427**, 364–370. <https://www.nature.com/articles/nature02256> (2004).
86. Sahl, S., Well, S. & Jakobs, S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 685–701. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28875992/> (2017).
87. Santaguida, S. & Amon, A. Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 473–485. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26204159/> (2015).

88. Sawin, K., LeGuellec, K., Philippe, M. & Mitchison, T. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* **359**, 540–543. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1406972/> (1992).
89. Shimamoto, Y., Forth, S. & Kapoor, T. Measuring Pushing and Braking Forces Generated by Ensembles of Kinesin-5 Crosslinking Two Microtubules. *Dev Cell* **34**, 669–681. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26418296/> (2015).
90. Sikirzhyski, V. *et al.* Direct kinetochore-spindle pole connections are not required for chromosome segregation. *J Cell Biol* **206**, 231–243. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25023516/> (2014).
91. Skibbens, R., Rieder, C. & Salmon, E. Kinetochore motility after severing between sister centromeres using laser microsurgery: evidence that kinetochore directional instability and position is regulated by tension. *J Cell Sci* **108**, 2537–2548. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7593295/> (1995).
92. Steblyanko, Y. *et al.* Microtubule poleward flux in human cells is driven by the coordinated action of four kinesins. *EMBO J* **39**. <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/emboj.2020105432> (2020).
93. Stumpff, J., von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C. & Wordeman, L. The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev Cell* **14**, 252–262. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18267093/> (2008).
94. Takagi, J., Sakamoto, R., Shiratsuchi, G., Maeda, Y. & Shimamoto, Y. Mechanically Distinct Microtubule Arrays Determine the Length and Force Response of the Meiotic Spindle. *Dev Cell* **49**, 267–278. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30982663/> (2019).
95. Tamura, N. *et al.* Specific Mechanisms of Chromosomal Instability Indicate Therapeutic Sensitivities in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Cancer Research* **80**, 4946–4959. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32998996/> (2020).
96. Tischer, C., Brunner, D. & Dogterom, M. Force- and kinesin-8-dependent effects in the spatial regulation of fission yeast microtubule dynamics. *Mol Syst Biol* **5**, 250. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19293830/> (2009).
97. Tolić, I. Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. *Eur Biophys J* **47**, 191–203. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00249-017-1244-4> (2018).

98. Tolić-Nørrelykke, I., Sacconi, L., Stringari, C., Raabe, I. & Pavone, F. Nuclear and division-plane positioning revealed by optical micromanipulation. *Curr Biol* **15**, 1212–1216. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16005294/> (2005).
99. Valentine, M., Fordyce, P., Krzysiak, T., Gilbert, S. & Block, S. Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro. *Nat Cell Biol* **8**, 470–476. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16604065/> (2006).
100. Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S. & Howard, J. Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. *Cell* **138**, 1174–1183. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19766569/> (2009).
101. Varga, V. *et al.* Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat Cell Biol* **8**, 957–962. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16906145/> (2006).
102. Vukušić, K. *et al.* Microtubule Sliding within the Bridging Fiber Pushes Kinetochore Fibers Apart to Segregate Chromosomes. *Dev Cell* **43**, 11–23. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29017027/> (2017).
103. Waters, J., Skibbens, R. & Salmon, E. Oscillating mitotic newt lung cell kinetochores are, on average, under tension and rarely push. *J Cell Sci* **109**, 2823–2831. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9013330/> (1996).
104. Webster, A. & Schuh, M. Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends Cell Biol* **27**, 55–68. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27773484/> (2017).
105. West, R., Malmstrom, T. & McIntosh, J. Kinesins klp5(+) and klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. *J Cell Sci* **115**, 931–940. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870212/> (2002).
106. XVIVO Scientific Animation. *The Inner Life of the Cell* <https://xvivo.com/examples/the-inner-life-of-the-cell/>.

Životopis

Domagoj Božan rođen je 31. ožujka 1997. godine u Splitu. Osnovnoškolsko obrazovanje započinje 2003. godine u Osnovnoj školi Majstora Radovana u Trogiru, a završava ga 2011. godine. Iste godine u Trogiru upisuje i Srednju školu Ivana Lucića, koju završava 2015. godine. Upisuje studij Fizika - istraživački smjer na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje diplomira 4. rujna 2020. godine s temom "Klasifikacija promjenjivih zvijezda pomoću metoda strojnog učenja" pod mentorstvom dr. sc. Lovre Palaverse. Od 11. siječnja 2021. zaposlen je kao asistent na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za teorijsku fiziku u grupi prof. dr. sc. Nenada Pavina, u sklopu čega radi i doktorat na ERC projektu "Molecular origins of aneuploidies in healthy and diseased human tissues (Aneuploidy)". Kao asistent, držao je vježbe na kolegijima Fizika za studente Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, smjer molekularna biologija i Fizički praktikum 1 za studente Fizičkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, nastavnički smjer. Aktivno je sudjelovao, usmenom prezentacijom ili posterom, na četiri međunarodna i dva domaća znanstvena skupa te na četiri sastanka projekta. U sklopu znanstvenog rada napisao je jedan članak na kojem je dijeljeni prvi autor i koji je objavljen u Current Contents znanstvenom časopisu. Također je sudjelovao u pisanju jednog članka koji je trenutno u procesu recenzije te u pisanju još jednog trenutno neobjavljenog članka.

Popis radova:

1. Risteski, P., Božan, D., Jagrić, M., Bosilj, A., Pavin, N., Tolić, I.M. Length-dependent poleward flux of sister kinetochore fibers promotes chromosome alignment. Cell Reports 40., DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111169> (2022)
2. Sigmund, I., Božan, D., Šarić, I., Pavin, N. Motor proteins in antiparallel microtubule overlaps drive chromosome congression during mitotic spindle assembly, bioRxiv, DOI: <https://doi.org/10.1101/2024.05.10.593475> (2024)

Održana predavanja na znanstvenim skupovima i sastancima:

1. ERC Synergy project Aneuploidy meeting, Dubrovnik, Republika Hrvatska, 2021. (sastanak projekta)
2. CMD-29 FisMat, Manchester, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2022. (znanstveni skup)
3. DPG-(Frühjahrs)tagungen 2022, Regensburg, Njemačka, 2022. (znanstveni skup)
4. ERC Synergy project Aneuploidy meeting, Zagreb, Republika Hrvatska, 2023 (sastanak projekta)
5. CMD-30 FisMat, Milano, Italija, 2023. (znanstveni skup)
6. Joint ERC Retreat, Sitges, Španjolska, 2023. (sastanak projekta)
7. DPG-(Frühjahrs)tagungen 2024, Berlin, Njemačka, 2024. (znanstveni skup)
8. Kick-off meeting of the joint SNSF-HRZZ project, Split, Republika Hrvatska, 2024 (sastanak projekta)

Održani poster na znanstvenim skupovima:

1. Mitotic spindle: From living and synthetic systems to theory, Split, Republika Hrvatska, online, 2021.
2. Mitotic spindle: From living and synthetic systems to theory, Dubrovnik, Republika Hrvatska, 2023.