Oscilacije kinetohora u metafazi

Turković, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:646531

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Marija Turković

OSCILACIJE KINETOHORA U METAFAZI

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

SMJER: ISTRAŽIVAČKI

Marija Turković

Diplomski rad

Oscilacije kinetohora u metafazi

Voditelj diplomskog rada: Matko Glunčić

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

Datum polaganja: _____

Zagreb, 2017.

Sažetak

Oscilacije kinetohora primijećene su u različitim organizmima od kvasca do sisavaca. Te se oscilacije javljaju dok stanica provjerava jesu li sve kinetohore ispravno spojene, što je poznato kao kontrolna točka diobenog vretena. Stoga je važno razumjeti mehanizam oscilacija kinetohora kako bi se razjasnilo kako stanica regulira sile napetosti između sestrinskih kinetohora. Oscilacije kinetohora ovise o dinamici mikrotubula koja uključuje rast mikrotubula i njihovo skraćivanje, a time i o specifičnim faktorima koji upravljaju vjerojatnošću da se mikrotubul nađe u stanju rasta ili skraćivanja.

Cilj ovog istraživanja je pokazati na koji način se mijenja gustoća motora na mikrotubulima korištenjem Laplaceovog transformata te derivacijom pomoću metode konačnih razlika. Nakon toga se izrađuje model oscilacija kinetohora - jedan fizikalni i jedan maksimalno pojednostavljeni, te se uspoređuje ponašanje ta dva modela za različite sustave mikrotubula i kinetohora.

Kinetochore oscillations in metaphase

Abstract

Kinetochore oscillations have been observed in a variety of organisms, from yeast to mammals. These oscillations occur while the cell checks whether all the kinetochores are properly merged, which is known as the mitotic checkpoint. Therefore, it is important to understand the mechanism of kinetochore oscillation to clarify how cells regulate the tension force between sister kinetochores. Kinetochore oscillations depend on the microtubule dynamics which involves the growth and shrinkage of the microtubule, and thus on the specific factors that control the probability that the microtubule finds itself in a state of growth or shrinkage.

The aim of this study is to show how the motor density is changing by using the Laplace transform and by derivation using finite difference methods. Afterwards, two kinetochore oscillation models are created. One physical and one completely simplified. The models are then compared for different microtubule and kinetochore systems.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1 Mikrotubuli i dinamička nestabilnost 1
1.2 Molekularni motori 3
1.3 Kinetohore i direkcijska nestabilnost 5
1.4 Metafazno gibanje kinetohora 6
2. Metode 11
2.1 Raspodjela motora na mikrotubulu 11
2.2 Izrada modela oscilacija kinetohora 13
2.2.2 Model s fizikalnim parametrima 14
2.2.1 Minimalni model 20
3. Rezultati i diskusija 22
3.1 Simulacija s fizikalnim parametrima 24
3.2 Minimalna simulacija oscilacija kinetohora 29
4. Zaključak 31
Dodaci 32
A: Analitičko rješenje gustoće motora na mikrotubulu 32
B: Metoda konačnih razlika 36
Literatura 40

1. Uvod

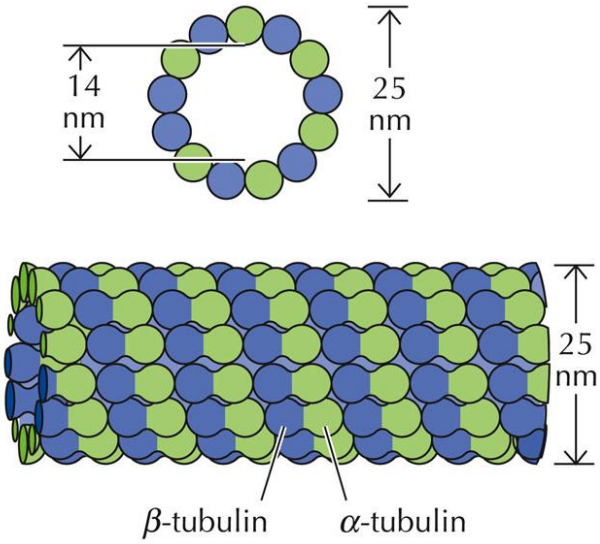
Za pravilnu podjelu genetskog materijala potrebno je da se sestrinske kromatide svakog kromosoma vežu na mikrotubule putem kinetohora, proteinskih kompleksa na kromosomu, nakon čega ovaj sustav oscilira oko ekvatorijalne ravnine diobenog vretena. Oscilacije kinetohora primijećene su u različitim organizmima od kvasca do sisavaca. Te se oscilacije javljaju dok stanica provjerava jesu li sve kinetohore ispravno spojene, što je poznato kao kontrolna točka diobenog vretena. Stoga je važno razumjeti mehanizam oscilacija kinetohora, kako bi se razjasnilo kako stanica regulira sile napetosti između sestrinskih kinetohora. Oscilacije kinetohora ovise o dinamici mikrotubula, koja uključuje rast mikrotubula i njihovo skraćivanje. Ta svojstva mikrotubula reguliraju proteini poput motora kinezina-8, za koje je pokazano da potiču katastrofu mikrotubula i njihovo skraćivanje. Međutim, uloga kinezina-8 u oscilacijama još uvijek nije teorijski istražena.

1.1 Mikrotubuli i dinamička nestabilnost

Mikrotubuli su unutarstanične strukture koje se nalaze u citoplazmi eukariotskih stanica, te u nekim bakterijama. Sudjeluju u diobi stanice, međustaničnom transportu, te osiguravaju mehaničku potporu u stanici.

Sve eukariotske stanice proizvode tubulin - protein od kojega se grade mikrotubuli u strukturu dugog i šupljeg cilindra. Stanice imaju najmanje dva tipa tubulina – α i β tubulin, koji zajedno čine građevni element mikrotubula, a to je αβ heterodimer. Kada su uvjeti pogodni, nastale strukture tubulina se slažu u mikrotubule, koji mogu biti dugački čak i do 50 μm. [1].

Mikrotubuli imaju određenu polarnost koja je nužna za njihovu biološku funkcionalnost (slika 1.1). Polarnost nastaje zbog svojstva grupiranja α i β tubulina u veće strukture, te posljedično jedan kraj mikrotubula ima izložene α, a drugi β tubuline. Dogovorno je minus dio mikrotubula onaj u centru stanice, dok je plus dio na vanjskim dijelovima.



Slika 1.1: Grupiranje α i β tubulina unutar mikrotubula [2].

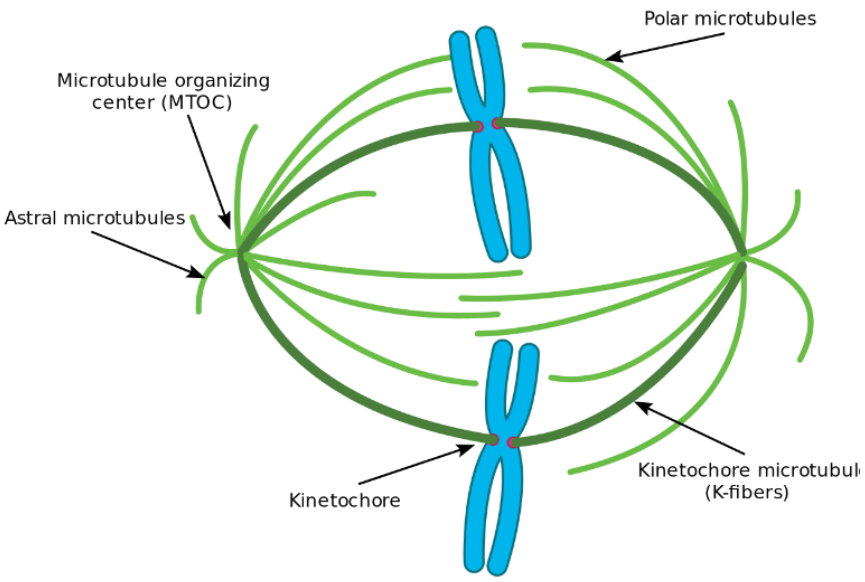
Individualni MT* su dinamički nestabilni, te se spontano prebacuju iz stanja rasta (polimerizacije) u stanje skraćivanja (depolimerizacije) i obrnuto [3]. Rast i skraćivanje mikrotubula primarno se događa na plus-krajevima mikrotubula (odnosno, na β tubulinu), što daje osnovu dinamičke nestabilnosti. Promjena iz stanja rasta u stanje smanjivanja se naziva katastrofa, a obrnuti proces se naziva spas. Brzina rasta, smanjivanja i učestalost promjene stanja je regulirana silama na krajevima mikrotubula.

Dinamika mikrotubula je ključna za diobu stanice, tijekom koje se formira diobeno vreteno - struktura koja se sastoji od mikrotubula koji rastu iz polova na suprotnim krajevima stanice.

Dinamički nestabilne MT diobenog vretena stvaraju veze s kinetohorama [4] – proteinskim kompleksima koji se okupljaju na centromeru svakog kromosoma. U slučajevima nekih eukariota, na pojedinu kinetohoru je vezano više mikrotubula, što vodi na kolektivno ponašanje mikrotubula koje se ne razumije posve, te može biti potpuno drugačije od njihovog individualnog ponašanja.

Mikrotubuli diobenog vretena se dijele na dvije klase ovisno o tome da li su vezani na kinetohoru ili ne (slika 1.2). Ukoliko se na kinetohoru veže više mikrotubula, oni tvore paralelne MT-snopove, poznatije pod nazivom kinetohorna (k-) vlakna.

* MT – kratica za mikrotubul.



Slika 1.2: Diobeno vreteno [5].

Iako su k-vlakna ugrađena u kinetohore, plus-krajevi individualnih mikrotubula ostaju dinamični, s učestalošću promjena stanja koji su 20 puta sporiji nego kod slobodnih mikrotubula [6]. Ključ razumijevanja kako kinetohore generiraju usmjereno gibanje i poravnavaju kromosome nalazi se u identifikaciji proteina i molekularnih mehanizama koji koordiniraju dinamiku individualnih plus-krajeva mikrotubula unutar k-vlakna.

1.2 Molekularni motori

Mreža polimera nužna za dinamičku organizaciju eukariotskih stanica naziva se citoskelet. Njegova funkcija ovisi o komponentama kao što su molekularni motori – proteinski strojevi koji koriste energiju oslobođenu hidrolizom ATP-a* za obavljanje mehaničkog rada – gibanja [7]. Posljedica tog usmjerenog gibanja je neuniformna prostorna raspodjela motora.

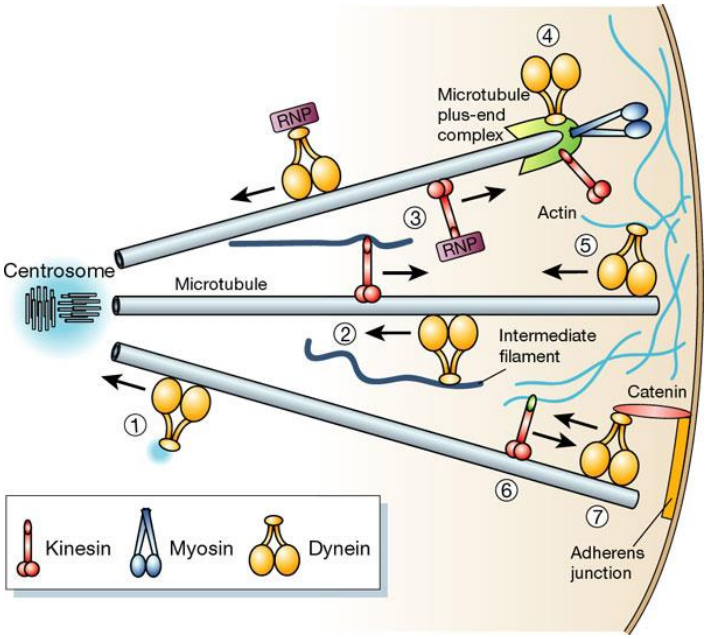
Motori prenose široki spektar tereta do njihovih odredišta, daju energiju staničnom gibanju, te pogone staničnu diobu. Na većoj skali oni omogućavaju kretanje organizma, što se između ostalog može prikazati na primjeru kontrakcije mišića.

* Adenozin trifosfat je molekula koja vrši prijenos energije rastavljanjem na adenozin difosfat i fosfat.

Određena klasa molekularnih motora koja posjeduje mogućnost gibanja po nekoj određenoj površini naziva se motorni protein. Najproučavaniji motorni proteini su proteini citoskeleta koji se dijele u dvije kategorije prema svojstvima površine po kojoj se gibaju – aktinski miozin, te mikrotubularni kinezin i dinein (slika 1.3).

MT motori stvaraju silu na mikrotubule kako bi pomicali jezgru, organele i vretena u eukariotskim stanicama. Mnogo toga je poznato o ponašanju individualnih molekularnih motora *in vitro*, no *in vivo* – više motora djeluje zajedno. Glavno pitanje je kako više motora i mikrotubula organizira ponašanje u zajedničko gibanje u živoj stanici [8].

Motori mikrotubula se pak dijele na dvije kategorije pozitivnih i negativnih motora s obzirom na smjer kojim se gibaju (kinezin i dinein), što je moguće zbog svojstva polarnosti mikrotubula.



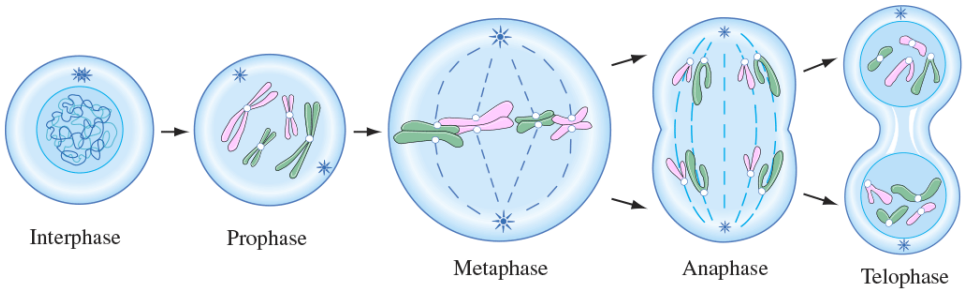
Slika 1.3: Prikaz molekularnih motora [9].

Kinezin je protein koji pripada klasi mikrotubularnih motornih proteina i koji se mogu naći u eukariotskim stanicama. On se giba po mikrotubulu s dvije "nožice", od kojih je jedna uvijek pričvršćena za mikrotubul, a teret prenosi "šetnjom" po mikrotubulima - pri svakom koraku se odvija hidroliza (cijepanje kemijskih veza u reakciji s vodom) jedne molekule ATP-a, te tako kinezin dobiva potrebnu energiju koju pretvara u mehanički rad.

Na taj način motori mogu prijeći vrlo značajne udaljenosti. Kinezin prenosi stanični teret pomičući se iz negativnog prema pozitivnom kraju mikrotubula, što je od presudne važnosti za separaciju kromosoma tijekom diobe stanica.

1.3 Kinetohore i direkcijska nestabilnost

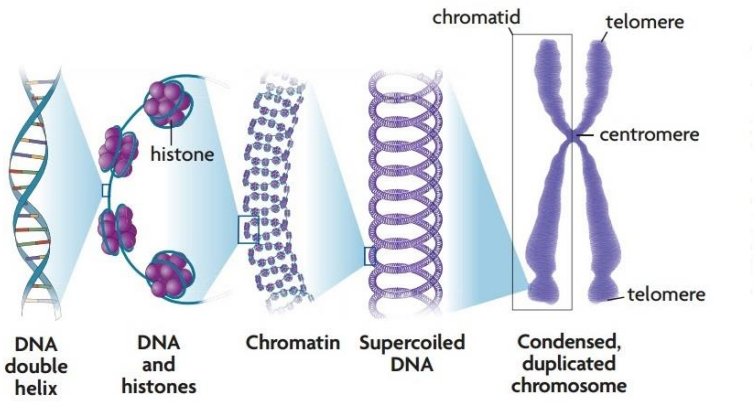
U eukariotskim stanicama, DNA je složena u strukture koje se nazivaju kromosomi. Prije nego što se stanica podijeli, kopira se čitav set kromosoma i nastaju sestrinske kromatide. Nakon toga se one odvajaju i na taj način se osigurava da svaka novonastala stanica ima pun set kromosoma [10].



Slika 1.4: Pojednostavljeni prikaz tijeka diobe stanice [11].

Za točnu podjelu genetskog materijala potrebno je da se sestrinske kromatide svakog kromosoma vežu na mikrotubule diobenog vretena putem kinetohora – specijaliziranih višeproteinskih struktura na kromosomu. Kinetohore se nalaze na centromeru svakog para sestrinskih kromatida, koji je kod većine eukariota reda veličine nekoliko mikrometara, te može vezati i do 25 mikrotubula. Kinetohore sisavaca tipično vežu između 20 i 25 mikrotubula [12].

Jednom kada kinetohore uspostave stabilnu vezu s mikrotubulima koji dolaze iz suprotnih krajeva stanice, jedna od njihovih glavnih funkcija je da pogone kromosome kroz metafazu. Kinetohore pomiču kromosome regulacijom dinamike plus-kraja pričvršćenog mikrotubula [13].



Slika 1.5: Detaljni prikaz kromosoma [14].

Snopovi MT vezanih na kinetohore izmjenjuju se između stanja rasta i smanjivanja, dinamička nestabilnost vodi na oscilacije na metafaznoj ravnini, a kinetohore imaju periode relativno konstantne brzine koji su prekinuti vrlo naglim promjenama u smjeru – ponašanje koje se naziva direkcijska nestabilnost [10]. Međutim, mehanizam kojim kinetohore kontroliraju dinamiku plus-kraja mikrotubula se tek počeo upoznavati.

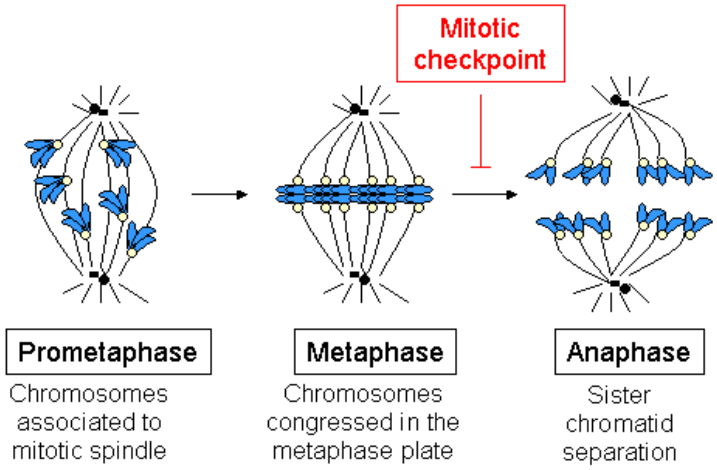
Proučavanje kinetohora je otežano jer su proteini koji ih grade prisutni u vrlo malim količinama [15]. Dodatna poteškoća je i to da mehanizam koji koordinira dinamiku plus kraja MT ne može biti direktno izmjeren jer kinetohore nisu vezane za jednu, nego više mikrotubula, a svaki MT ima drugačiju dinamiku. Također, struktura kinetohora jako varira od organizma do organizma, te su sekvence proteina kinetohora vrlo divergentne zbog procesa evolucije [16], no povećanje sekvenciranih genoma i broja zabilježenih proteina kinetohora tijekom vremena ipak je dozvolilo precizniju bioinformatičku analizu [17].

Eksperimenti su pokazali da se laserskim oštećenjima centromernog kromatina koji povezuje sestrinske kinetohore narušava njihovo koordinirano ponašanje. To je dovelo do modela gdje postoji određena napetost centromernog kromatina na kojoj se pokreće promjena smjera gibanja sestrinskih kinetohora.

1.4 Metafazno gibanje kinetohora

Vjerna segregacija kromosoma je osnovna funkcija stanice. Tijekom diobe, kromosomi pomoću kinetohora uspostavljaju veze s mikrotubulima sa suprotnih polova diobenog vretena prije početka anafaze.

Precizna segregacija sestrinskih kromatida započinje kada se obje kromatide spoje na mikrotubule i posljedično se pomiču u sredinu diobenog vretena (slika 1.6).



Slika 1.6: Kongresija kromosoma na metafaznu ravninu [18].

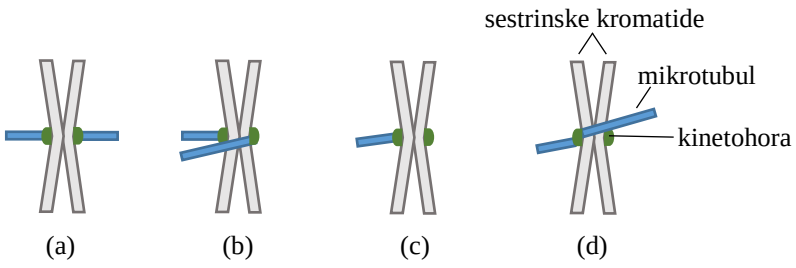
Kromosomi se poravnavaju po metafaznoj ravnini koja se formira ekvidistantno između polova stanice zbog sila koje su generirane motorima vezanim na kinetohore. Proces poravnavanja naziva se kromosomska kongresija. Jednom kada su kromosomi dobro poravnati po ekvatoru diobenog vretena, sestrinske kromatide se odvajaju i gibaju istovremeno prema polovima, s centromerima koji se rastežu zbog sila koje vuku kromatide.

Ispravna segregacija kromosoma ovisi o dobroj orijentaciji parova kinetohora (slika 1.7.a) tako da se sestrinska kinetohora spaja sa odgovarajućim polom vretena (kromosomska biorijentacija). Napetost rastegnutog centromera je važna za stabilizaciju veza mikrotubula i kinetohora – drugim riječima, biorijentirane kinetohore su pod utjecajem napetosti, dok neispravno spojene kinetohore nisu.

Pogrešni spojevi kinetohora i mikrotubula su česti tijekom rane diobe. Većina ih se ispravi prije početka anafaze mehanizmom koji destabilizira mikrotubule ukoliko ne postoji napetost između sestrinskih kromatida [4].

Točan poredak sestrinskih kinetohora je nužan kako bi se spriječio gubitak kromosoma kroz defekte, poput spojeva prikazanih na slikama 1.7 (b), (c) i (d).

Problemi u spajanjima i kromosomskoj segregaciji mogu rezultirati aneuploidijom (poremećajem broja kromosoma), kojom nastaje neravnoteža u genetskom materijalu povezana s defektima prilikom rođenja ili razvojem raka.



Slika 1.7: Mogući spojevi kinetohora i mikrotubula. Na slici (a) je prikaz amfitelnog tipa spoja mikrotubula i sestrinskih kromatida, odnosno prikaz kromosomske biorijentacije. Na slici (b) je prikazan sintelni tip spoja MT i kromatida – radi se o kromosomskoj monoorijentaciji. Monotelni spoj samo jedne sestrinske kromatide je prikazan na slici (c), dok (d) prikazuje merotelni tip spoja mikrotubula i kinetohore.

Iako su kromosomi poravnati s ekvatorom vretena i usprkos održavanju poretka na metafaznoj ravnini, oni nisu nužno statični. Istraživanja su pokazala da se biorijentirani kromosomi gibaju konstantnim brzinama i imaju nagle promjene smjera [19]. Drugim riječima, poravnavanje je dinamičko, sa kromosomima koji osciliraju oko svoje pozicije tijekom metafaze.

Sestrinske kinetohore koje su spojene na kromosome prolaze kvazi-periodična oscilacijska gibanja koja traju i do nekoliko minuta [20]. Te se oscilacije javljaju tijekom metafaze, dok stanica provjerava jesu li sve kinetohore ispravno spojene, što je poznato kao kontrolna točka diobenog vretena.

Ispravno spojena kinetohora pokazuje dva tipa oscilacija - oscilacije centra mase i *breathing* oscilacije gdje se regulacijom kolektivne dinamike MT mijenja duljina između dvaju kinetohora [21]. Konzistentna teorija metafazne dinamike kinetohora i mikrotubula bi trebala opisati *breathing* oscilacije te oscilacije centra mase za ispravno spojene parove i razjasniti doprinose napetosti na ispravnu segregaciju kromosoma.

Kao doprinos oscilatornom gibanju kromosoma je istraživano mnogo faktora: nestabilnost usmjerenosti kinetohora, tok MT prema polovima, napetost rastegnutog centromera, gibanje sestrinskih kromatida, dinamička nestabilnost mikrotubula ili pak promjene u koncentraciji proteina na kinetohorama koje ovise o njihovoj duljini. Usprkos

tome, još uvijek nije jasno kako dvije sestrinske kromatide mogu komunicirati međusobno, te na taj način koordinirati vlastito gibanje.

Stoga je glavno pitanje proučavanja diobe stanice prostorna regulacija dinamike krajeva mikrotubula unutar diobenog vretena tako da su kromosomi poravnati na ekvator vretena [22].

Plus krajevi MT koji su spojeni na kromosome ostaju dinamični i tijekom metafaze – te je vjerojatno da oscilacije kromosoma reflektiraju dinamiku rasta i smanjivanja na krajevima MT. Svojstva mikrotubula reguliraju proteini poput motora kinezina-8, za koje je pokazano da potiču katastrofu mikrotubula i njihovo skraćivanje. Međutim, uloga kinezina-8 u oscilacijama još uvijek nije teorijski istražena.

Ovisnost katastrofe plus kraja mikrotubula bazirane na njegovoj duljini može dati efikasni mehanizam za dobivanje dinamike mikrotubula u diobenom vretenu koja bi promovirala kromosomsku kongresiju tijekom diobe stanice.

Alternativni mehanizam za kongresiju pretpostavlja da kinetohore mogu osjetiti svoj položaj unutar vretena [23]. Iako nema dokaza koji bi poduprli mehanizam koji dozvoljava kinetohorama da nadgledaju svoje pozicije unutar vretena, motorni proteini kinezina-8 imaju potencijal da obavljaju takvu ulogu. Nadalje, istraživanja pokazuju da su kinezin-8 motori nužni za pravilno poravnavanje kromosoma tijekom diobe [24].

Međutim, iako su nedavna *in vivo* i *in vitro* proučavanja kinezina-8 razjasnila doprinos koji molekularni motori daju diobenoj kongresiji kromosoma, otvorena pitanja su još uvijek prisutna. Na primjer, u kvascima u kojima svaka kinetohora ima pridružen samo jedan MT, osiromašenje kinezina-8 nema utjecaj na pravilnu kongresiju kinetohora [25].

Smatra se da kromosomska kongresija na metafaznu ravninu, odnosno održavanje poravnatosti, ovisi primarno o motorima, biofizičkim svojstvima MT i regulatorima MT dinamike (npr. kinezin 13) [26].

Na krajevima kinetohora se akumulira više vrsta motora koji reguliraju MT dinamiku. Neki od njih mijenjaju brzinu kinetohornih oscilacija, smanjuju amplitudu preanafaznih oscilacija i usporavaju gibanje prema polovima tijekom anafaze. Ukratko - imaju funkciju sprečavanja gibanja kromosoma. Istraživanja ukazuju na to da ljudski kinezin-8 molekularni motori promoviraju kongresiju kromosoma atenuacijom magnitude kromosomskih oscilacija [27].

Međutim, kako su ovi MT proteini također povezani sa plus-krajevima slobodnih MT vretena i jer slobodni i kinetohorni MT plus krajevi imaju različite učestalosti promjene stanja tubulina, pretpostavlja se da specifični faktori vezani za kinetohore moraju upravljati MT dinamikom.

2. Metode

Glavna motivacija za ovaj rad je bila vizualno prikazivanje ponašanja sustava mikrotubula i kinetohora. No, prije toga je bilo potrebno usporediti metode deriviranja kako bi se odabrala ona odgovarajuća. Isto tako je bilo potrebno provjeriti da li postoje značajnija odstupanja numeričkog rješenja od analitičkog za danu metodu deriviranja.

Nakon ovih testiranja, moguće je krenuti s izradom fizikalnog i pojednostavljenog modela oscilacija kinetohora, te njihovim vizualnim prikazom.

2.1 Raspodjela motora na mikrotubulu

Radi što točnije analize sustava, razmatra se nekoliko različitih metoda parcijalne derivacije na primjeru gustoće motora na mikrotubulu. Cilj je odabrati najbolju metodu deriviranja, kako bismo mogli što bolje usporediti analitičko i numeričko rješenje jednadžbe za gustoću, te zaključiti da li je za ovaj sustav moguće kreirati dinamičke mikrotubule i promatrati njihovu promjenu tijekom vremena.

Model se sastoji od mikrotubula konačne duljine, koji raste konstantnom brzinom, te molekularnih motora koji se gibaju po mikrotubulu konstantnom brzinom. Također je uzeto u obzir da se motori vežu i oslobađaju s mikrotubula različitim vjerojatnostima.

Model gustoće $\rho(x,t)$ molekularnih motora na mikrotubulu dan je jednadžbom:

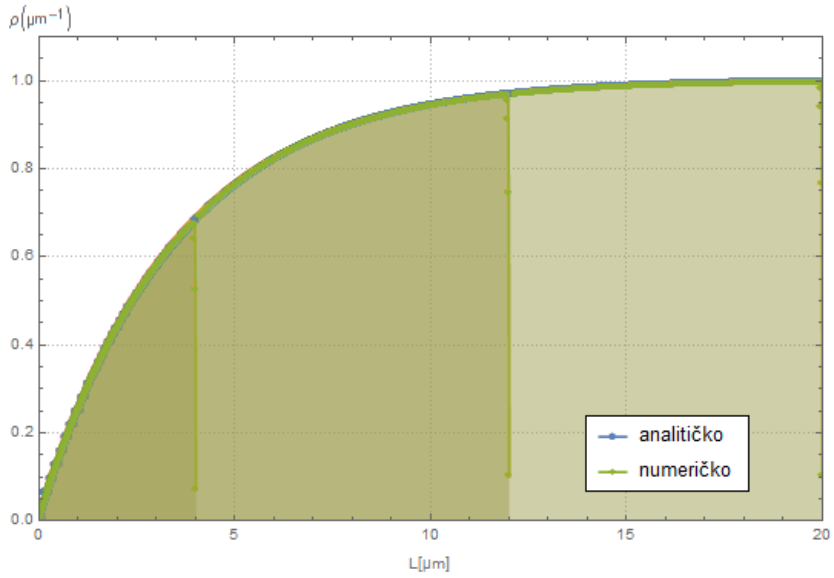
$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \alpha\Theta\left(v_g t - x\right) - \beta\rho - v_m \frac{\partial \rho}{\partial x}$$

Ovdje v_g označava brzinu rasta mikrotubula, a v_m je brzina motora. Konstante α i β govore o učestalosti vezanja, odnosno oslobađanja motora s mikrotubula.

Step funkcija $\Theta\left(v_g t - x\right)$ se odnosi na činjenicu da se motori mogu vezati samo za postojeći dio mikrotubula, koji se u trenutku t proteže do $x = v_g t$. Step funkcija Θ iznosi 1 za područje između 0 i $v_g t$, odnosno 0 za područje manje od 0 i veće od $v_g t$.

Izraz je moguće riješiti analitički korištenjem Laplaceovog transformata, uz uvjete $\rho(0,t)v_m = 0$, te $\rho(x,0) = 0$ (detaljan izvod se nalazi u dodatku A).

$$\rho(x,t) = \frac{\alpha}{\beta}\left[\Theta\left(v_g t - x\right)\left(1 - e^{\frac{x - v_g t}{v_g - v_m}\beta}\right) - \Theta(v_m t - x)\left(e^{\frac{-x}{v_m}\beta} - e^{\frac{x - v_g t}{v_g - v_m}\beta}\right)\right]$$



Slika 2.1: Usporedba analitičkog i numeričkog rješenja za $v_m = 14\ \mu m/min$. Za vrijednosti brzine rasta mikrotubula i brzine motora je uzeto: $v_g = 8\ \mu m/min$, $\beta = 4 min^{-1}$ te $\alpha = 4 \mu m^{-1} min^{-1}$. Promatra se usporedba raspodjele motora na mikrotubulu za tri različite vrijednosti vremena, odnosno $t = 0.5 min$, $t = 1.5 min$ i $t = 2.5 min$. Drugačije osjenčana područja odgovaraju raspodjeli motora u različitim vremenima.

Prilikom numeričkog simuliranja vremenske i prostorne ovisnosti gustoće motora bilo je nužno dovesti u pitanje točnost i ograničenja numeričke metode konačnih razlika. Na slici 2.1 je prikazana usporedba oba rješenja. Može se primijetiti da se ona iznimno dobro slažu, te da su njihove razlike gotovo neprimjetne.

Promatrala se raspodjela gustoće motora za tri različita trenutka, te se ni nakon jako puno vremenskih koraka nije moglo primijetiti neko odstupanje od analitičke funkcije.

Dodatno valja napomenuti da se u obzir nije uzeo efekt saturacije koji proizlazi iz činjenice da gustoća motora ima neku gornju granicu. Eksperimentalni podaci upućuju na to da su gustoće motora na mikrotubulima relativno niske.

Cilj je bio prikazati kako se gustoća motora na mikrotubulu mijenja s vremenom, te potvrditi ispravnost numerički dobivenih rješenja usporedbom s analitičkim rješenjem.

2.2 Izrada modela oscilacija kinetohora

Za proučavanje oscilacija sestrinskih kromatida razmatra se jedan par sestrinskih kinetohora i N mikrotubula koji dinamički međudjeluju s kinetohornim proteinima.

Postoje tri stanja u kojima se jedan mikrotubul može nalaziti – stanje rasta, stanje smanjivanja i stanje u kojemu je mikrotubul spojen na kinetohoru. U ovom modelu, svih N mikrotubula su u početnom trenutku u stanju polimerizacije koja se odvija konstantnom brzinom. Katastrofa je slučajan događaj koji ovisi o duljini mikrotubula – ukoliko je ispunjen uvjet za katastrofu, slijedi depolimerizacija konstantnom brzinom.

Ako se dosegne minimalna duljina od $0.1\mu m$, inducira se spas mikrotubula.

Molekularni motori su prisutni, te se vežu na mikrotubul i oslobađaju s njega učestalošću α i β. Ukoliko je brzina motora veća od brzine rasta mikrotubula, jednadžba za distribuciju motora se može svesti na izraz:

$$\rho(x,t) = \frac{\alpha}{\beta}\left(1 - e^{-\frac{\beta x}{v_m}}\right)$$

Uz uvjet $\rho(0,t) = 0$, moguće je izračunati koliko iznosi broj motora na plus-kraju mikrotubula [28]:

$$Q(x) = \frac{\alpha}{\beta^2}\left[v_m\left(1 - e^{-\frac{\beta x}{v_m}}\right) - v_g\left(1 - e^{-\frac{\beta x}{v_g}}\right)\right]$$

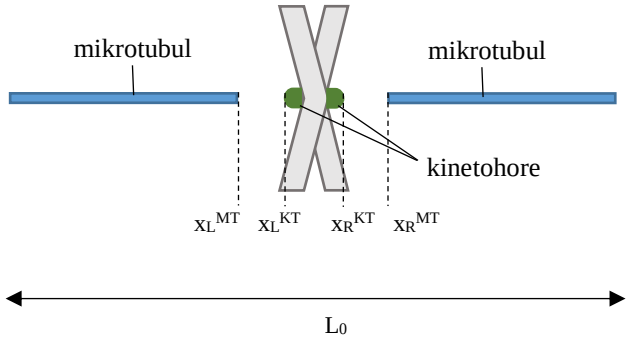
O broju motora na kraju mikrotubula ovisi učestalost induciranja katastrofe, k_{cat}. Veličina k_{res} se odnosi na učestalost induciranja spasa. Posljedično, vjerojatnost da se dogodi spas ili katastrofa u nekom vremenskom koraku dt glasi:

$$P_{res} = (1 - e^{-k_{res}\,dt}) \qquad P_{cat} = (1 - e^{-\,k_{cat}\,dt})$$

Za svaki korak dt generira se nasumičan broj r iz intervala [0,1]. Ukoliko su zadovoljeni uvjeti:

$$r < P_{res} \qquad r < P_{cat}$$

dolazi do promjene stanja mikrotubula i događa se spas, odnosno katastrofa.



Slika 2.2: Prikaz veličina koje se promatraju u modelu. Radi se o položajima plus krajeva mikrotubula, te o položaju kinetohora. Veličina L_0 predstavlja maksimalnu dužinu koju jedan mikrotubul može imati ukoliko nije spojen na kinetohoru.

Međutim, postoji još jedan slučaj – spajanje mikrotubula i kinetohora, koji se odvija ukoliko je zadovoljen uvjet: $x_L^{MT} > x_L^{KT} - d_0^{MT}$ s lijeve strane, odnosno za desnu stranu: $x_R^{MT} < x_R^{KT} + d_0^{MT}$.

U tom slučaju, gibanje ne ovisi samo o induciranju katastrofe i spasa, nego i o međusobnoj interakciji mikrotubula i kinetohore.

2.2.2 Model s fizikalnim parametrima

Kada rastući mikrotubul naiđe na prepreku, generira se sila guranja, dok smanjujući mikrotubul vuče za sobom strukture koje su ostale pričvršćene na njegov plus-kraj.

Ako se promatra kolektivno rastuće stanje N mikrotubula u kojemu jedan MT doživljava katastrofu i počne se smanjivati, napetost na ostale MT se povećava kako se kinetohora giba naprijed, a smanjujući MT se povlači. Međutim, sila smanjujućeg mikrotubula ne može nadjačati ukupnu silu rastućih mikrotubula. Štoviše, vrlo je malo vjerojatno da će jedan MT koji se smanjuje inducirati katastrofu ostalih mikrotubula. Umjesto toga, velika je vjerojatnost da će se inducirati spas smanjujućeg mikrotubula, te se kinetohora nastavlja gibati naprijed.

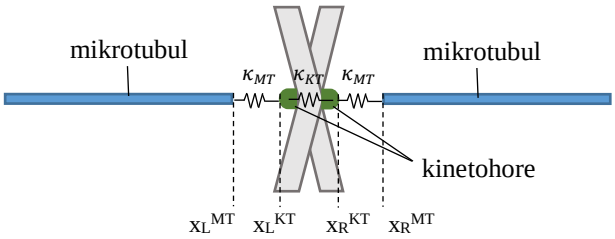
Svrha takvog gibanja je pravilna segregacija kromosoma. Sestrinske kromatide se poravnavaju na ekvatoru kako bi bilo moguće sa što većom preciznošću podijeliti kromosome na dva jednaka seta. Kako bi se točno odredio ekvator stanice, suprotne sile koje djeluju na biorijentirane kromosome moraju biti u ravnoteži.

Smjer i brzina gibanja kromosoma tijekom metafaze su određeni ravnotežom sila koje djeluju na pripadajuće kinetohore. Radi se o elastičnoj sili, sili trenja, te sili koja dolazi od polimerizacije i depolimerizacije mikrotubula sa svake strane kinetohora:

$$F_{MT} + F_{opruga} + F_{trenje} = 0$$

Pretpostavlja se da su sestrinske kinetohore povezane pomoću centromernog kromatina. Elastična sila se odnosi na oscilacije centromernog kromatina, odnosno položaja kinetohora x_L^{KT} i x_R^{KT}.

$$F_{opruga}^{KT} = \kappa_{KT}(x_R^{KT} - x_L^{KT} - d_0^{KT})$$



Slika 2.3: U ovome modelu, mikrotubuli su pričvršćeni na kinetohore pomoću opruga. Mikrotubuli promjenjive duljine se mogu smanjivati ili rasti.

Veličina koja se odnosi na konstantu opruge centromernog kromatina je κ_{KT}, a d_0^{KT} je njegov ravnotežni položaj.

Sile se s mikrotubula na kinetohore prenose preko konstanti opruga κ_{MT} koje ih povezuju. Mikrotubuli koji su spojeni na kinetohoru guraju ili vuku kinetohoru u x smjeru preko tih opruga:

$$F_{opruga}^{MT} = \kappa_{MT}(x_L^{KT} - x_L^{MT} - d_0^{MT})$$

$$F_{opruga}^{MT} = \kappa_{MT}(x_R^{KT} - x_R^{MT} + d_0^{MT})$$

Na staničnom nivou, viskozne sile dominiraju gibanjima, a inercijalni efekti su gotovo zanemarivi. Stoga sile koje djeluju na objekt mogu biti izjednačene s viskoznim članom koji je proporcionalan brzini. Ovo je vrlo korisno, jer se može upotrijebiti kako bi se izračunali položaji u sustavu za svaki vremenski korak dt - korištenjem ravnoteže sila u obliku para diferencijalnih jednadžbi.

U dodatku B je detaljnije opisana metoda konačnih razlika – numerička metoda deriviranja pomoću koje je moguće dobiti rješenje za položaje kinetohora i mikrotubula u svakom idućem vremenskom koraku dt, ukoliko se postave početni uvjeti.

U ovom modelu, bilo je potrebno postaviti vrijednosti veličina x_L^{KT}, x_R^{KT}, x_L^{MT} te x_R^{MT} u početnom trenutku. Pretpostavlja se da svih N mikrotubula počinje rasti iz nule, odnosno: $x^{MT}(t=0)=0$.

Za obje kinetohore se pretpostavlja da se u početnom trenutku nalaze u sredini stanice, te ne međudjeluju niti sa jednim mikrotubulom. Za oscilacije na metafaznoj ravnini u ovom modelu se nije promatrao položaj obje kinetohore, nego prosječna vrijednost njihovih položaja. U početnom trenutku vrijedi: $x^{KT}(t=0)=L_0/2$.

Sila trenja je proporcionalna brzini kinetohore:

$$F_{trenje} = -\gamma \frac{dx^{KT}}{dt}$$

Pretpostavlja se linearni odnos brzina mikrotubula i sila koje ovise o polimerizaciji i depolimerizaciji mikrotubula. Za lijevu stranu vrijedi:

$$F_{lijevi\ MT} = f_l^{+} N_l^{+} + f_l^{-} N_l^{-}$$

$$f_l^{\pm} = \pm f_0 \left(1 - \frac{dL}{dt}\frac{1}{v_0^{\pm}}\right)$$

Veličina $v_0^{\pm}$ se odnosi na brzinu polimerizacije $(v_0^{+} = v_g)$, odnosno depolimerizacije $(v_0^{-} = v_s)$ mikrotubula, N_l^{+} i N_l^{-} označavaju ukupni broj mikrotubula koji rastu, odnosno smanjuju se, a f_0 predstavlja zaustavnu silu kromosoma.

Derivacija dL/dt se odnosi na razliku duljina mikrotubula između dva vremenska koraka podijeljenu sa vrijednošću tog koraka.

Desna strana se može izračunati analogno.

Tijekom svakog koraka, računaju se i učestalosti katastrofe i spasa, koji za lijevu stranu glase:

$$k_{res}^{l} = k_0^{res} e^{\left(-\frac{f_l^-}{f_c^{res}}\right)} \qquad k_{cat}^{l} = k_0^{cat} + k_1^{cat} Q + k_0^{catf} e^{\left(-\frac{f_l^+}{f_c^{cat}}\right)}$$

Za desnu stranu se analogno može izračunati k_{res}^{r} i k_{cat}^{r}.

Za navedene učestalosti se pretpostavilo da ovise o konstantama f_c^{res} i k_0^{res} odnosno f_c^{cat} i k_0^{catf}, koje su predmet proučavanja ovoga rada.

Program je strukturiran na način da se nakon svakog vremenskog koraka računa da li se kinetohora pomiče u lijevu ili u desnu stranu. U svakom slijedećem koraku je bitno provjeriti da li je položaj kinetohore veći ili manji od položaja izračunatog u prethodnom koraku. Iz ta dva podatka se dobiva informacija o oscilacijama, odnosno da li se dogodila jedna oscilacija ili ne, te se za skup različitih parametara računa samo ukupan broj oscilacija koji se dogodio.

Podaci o oscilacijama se zatim zapisuju u datoteku. Ovdje je bilo potrebno maksimalno smanjiti zahtjeve programa, kako bi se simulacija uspjela izvršiti u što kraćem vremenu.

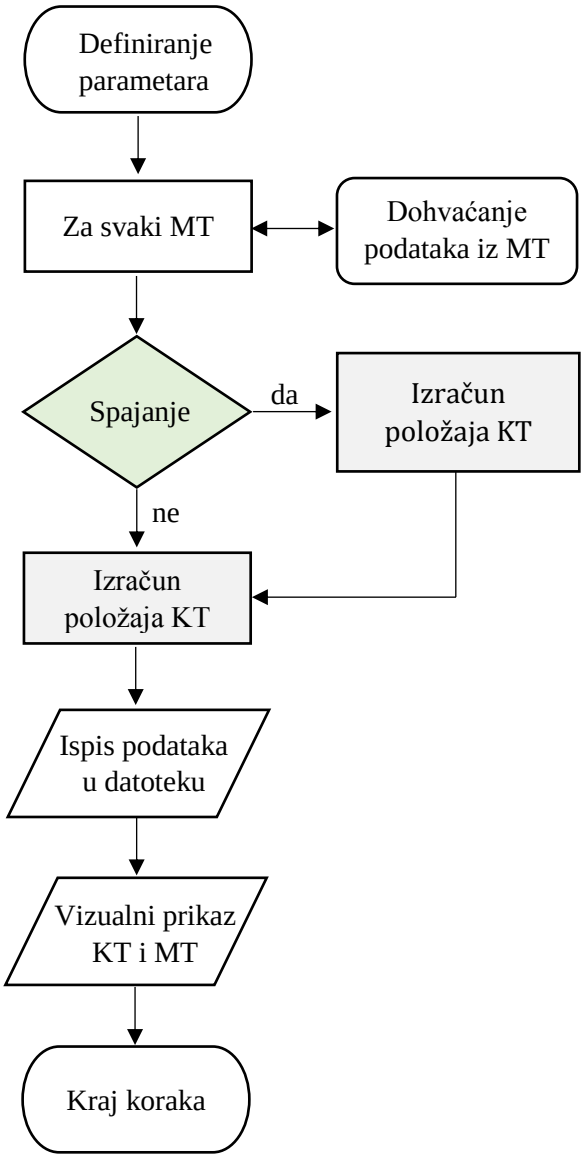
Za svaki mikrotubul se računaju pseudo-slučajni brojevi u rasponu od [0, 1]. Pseudo-slučajni brojevi su izabrani s jednakom vjerojatnošću iz konačnog seta brojeva, i nisu potpuno slučajni zbog matematičkog algoritma koji se koristi prilikom njihovog odabira, ali su dovoljno slučajni za praktičnu primjenu. U simulaciji oscilacija kinetohora, koriste se slučajni brojevi koji su odabrani prema sistemskom satu, odnosno broju "otkucaja". Jedan otkucaj predstavlja stotinu nanosekundi. Postoji 10 milijuna otkucaja tijekom jedne sekunde.

Kod je pisan u programskom jeziku C# u okviru *Microsoft .NET Framework-a 4*, te pomoću *Windows Presentation Foundation-a*.

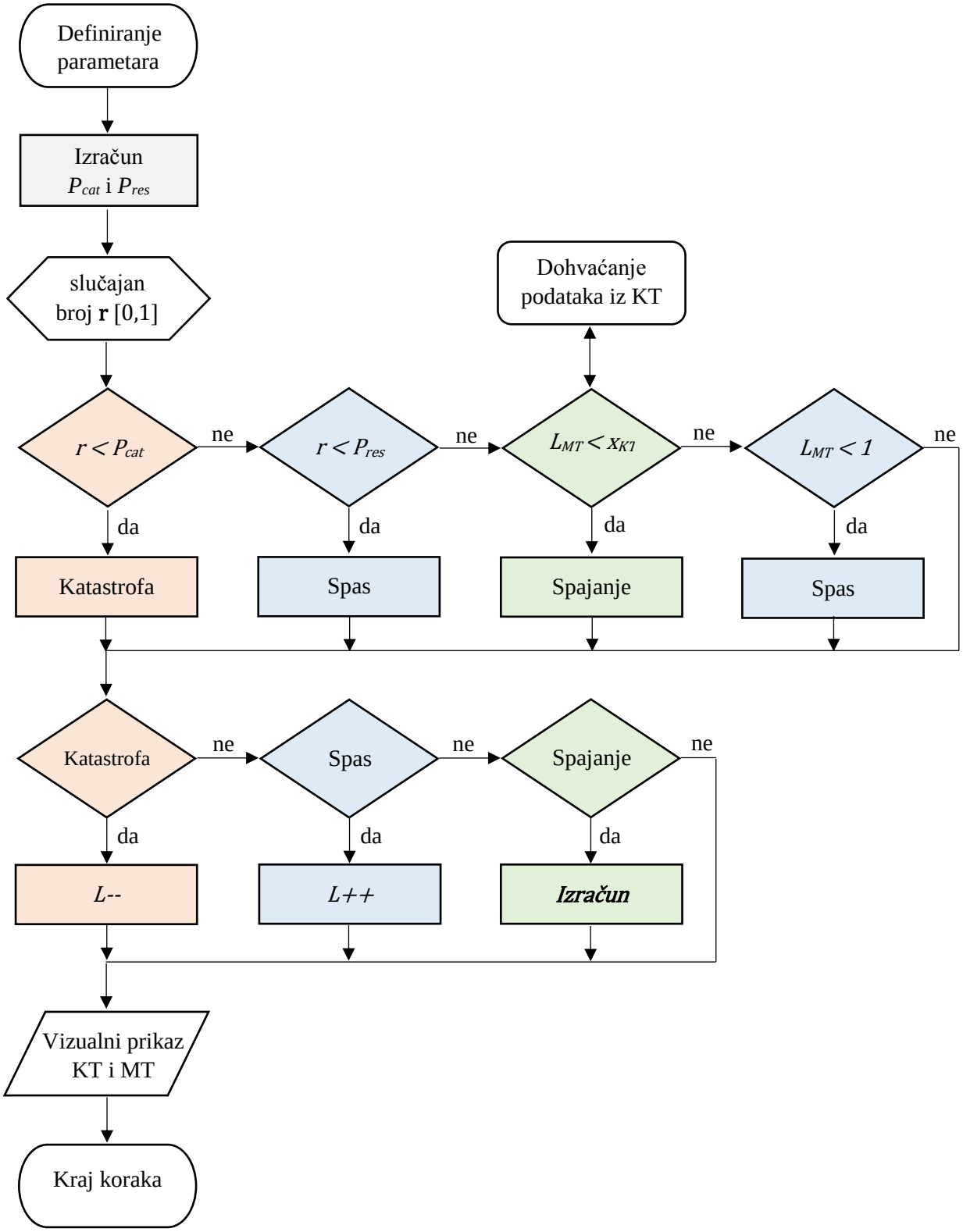
Najveći problem bio je izvršavanje jednog koraka za svaki objekt posebno, jer je C# strukturiran tako da se objekti zovu i izvršavaju redom - što znači da bi se prvo izvršile sve operacije u vremenu [0, T] za prvi mikrotubul, zatim za drugi, i tako dalje - te nema nikakve interakcije između objekata. Za tu svrhu se koristio *BackgroundWorker* - klasa koja je omogućila izvršavanje po jednog koraka za svaki mikrotubul i kinetohoru posebno, nakon čega kod šalje naredbe na grafičku karticu, te se prikazuje simulacija sustava. Nakon toga se kreće na novi vremenski korak.

Pojednostavljen dijagram toka za jedan vremenski korak dt je dan za računanje položaja kinetohora (slika 2.4) i položaja mikrotubula (slika 2.5).

Nakon što je bilo moguće vizualno provjeriti da se sustav dobro ponaša, moglo se krenuti sa analizom podataka. Sve vrijednosti konstanti koje su se koristile u modelu su navedene u tablici 2.1.



Slika 2.4: Dijagram toka koji prolaze kinetohore prilikom simulacije njihovih oscilacija u metafazi.



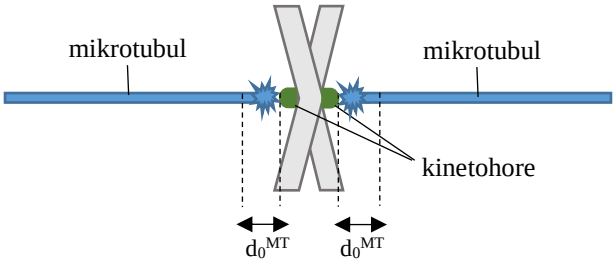
Slika 2.5: Dijagram toka koji prolazi jedan mikrotubul prilikom simulacije oscilacija kinetohora u metafazi.

veličina	vrijednost
v_g	0.03 μm min^{-1}
v_s	0.1 μm min^{-1}
v_m	3 μm min^{-1}
α	4 μm^{-1} min^{-1}
β	1 min^{-1}
L_0	20 μm
T	300 min
d_0^{MT}	0.1 μm
d_0^{KT}	0.5 μm
κ^{MT}	40 pN μm^{-1}
κ^{KT}	90 pN μm^{-1}
γ	100 pN min μm^{-1}
f_0	7 pN
k_0^{cat}	0.2 min^{-1}
k_1^{cat}	0.04 min^{-1}

Tablica 2.1: Vrijednosti konstanti koje su korištene prilikom simulacije oscilacija kinetohora u metafazi.

2.2.1 Minimalni model

Minimalni model je kreiran na način da se prilikom spajanja mikrotubula i kinetohore ne računa njihova međusobna ovisnost, nego se promatra samo gibanje oko položaja spajanja.



Slika 2.6: Prikaz veličina koje se promatraju u modelu. Radi se o položaju plus kraja mikrotubula koji se giba konstantnom brzinom oko položaja spajanja.

Položaji kinetohora se računaju kao srednje vrijednosti svih spojenih mikrotubula sa svake strane kromosoma, što znači i da gibanje nije kontinuirano, nego da postoje skokovi koji se događaju prilikom spajanja i otpajanja mikrotubula – odnosno prilikom svake promjene broja mikrotubula koji sudjeluju u interakciji s obje kinetohore.

Ukoliko se dogodi spajanje mikrotubula i kinetohore, odnosno ako je ispunjen bilo koji od uvjeta za lijevu i desnu stranu:

$$x_L^{MT} > x_L^{KT} - d_0^{MT} \qquad x_R^{MT} < x_R^{KT} + d_0^{MT}$$

računa se prosječna vrijednost $< x_L^{MT} >$ i $< x_R^{MT} >$. Tijekom svakog vremenskog koraka se provjerava da li su mikrotubuli još uvijek spojeni, te se iz toga računa položaj kromosoma:

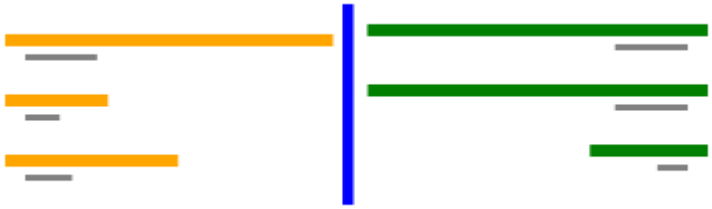
$$x_L^{KT} = \frac{\frac{< x_L^{MT} >}{N_{x_L^{MT}}} + \frac{< x_R^{MT} >}{N_{x_R^{MT}}}}{2}$$

Cilj je vidjeti kako izgleda parametarski prostor ovakvog modela u kojemu se položaji ne računaju preko ravnoteže sila, nego iz maksimalno pojednostavljenog gibanja mikrotubula, gdje se naglasak stavlja na ovisnost o induciranju katastrofe i spasa.

Algoritam koji prolaze kinetohore i mikrotubuli se generalno ne razlikuje od algoritma za fizikalni model oscilacija kinetohora – osim u načinu računanja položaja kinetohora i mikrotubula spojenih na njih. Taj korak je posebno označen na slikama 2.4 i 2.5, a sve konstante koje su bile potrebne za ovaj model su preuzete iz fizikalnog modela.

3. Rezultati i diskusija

Napravljen je model oscilacija kinetohora gdje se grafički prikazuju položaji mikrotubula i kinetohora (slika 3.1). Bilo je moguće prikazati i bilo koje druge vrijednosti za pojedini mikrotubul ili kinetohoru, što se pokazalo iznimno korisno tijekom same izrade modela radi vizualne provjere ponašanja varijabli sustava. Međutim, radi bolje preglednosti sustava, ispod svakog mikrotubula je samo dan broj motora na krajevima mikrotubula.



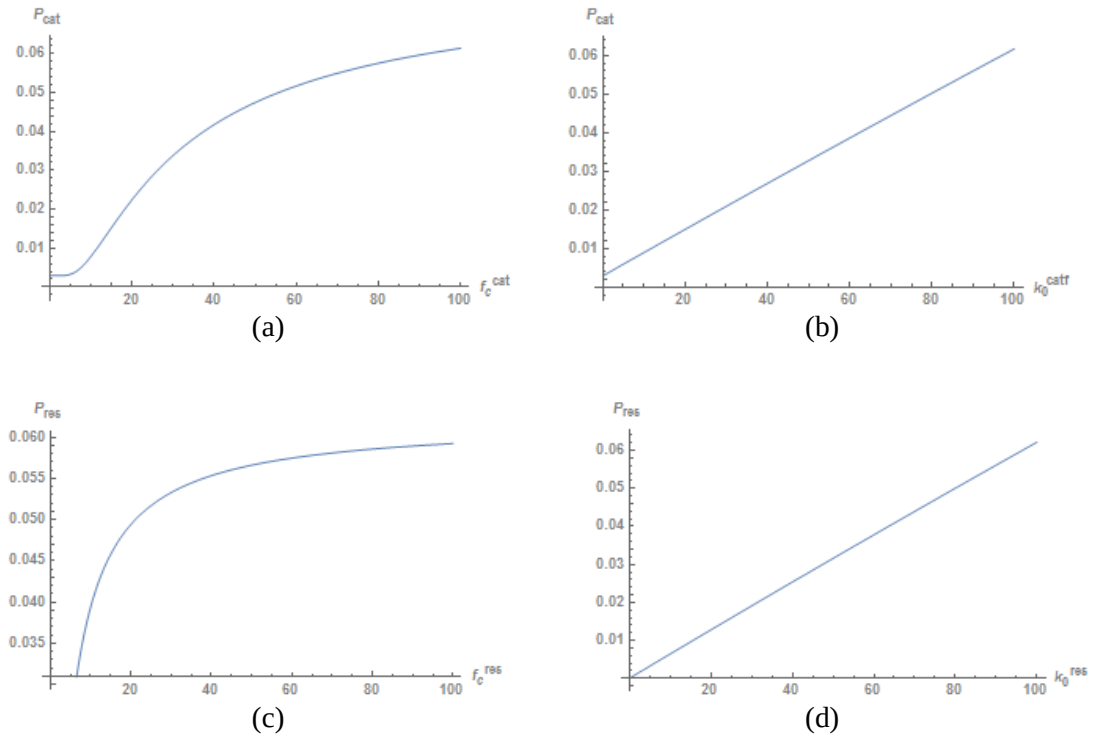
Slika 3.1: Grafički prikaz modela sa šest mikrotubula (zeleno i narančasto), te jednim parom kinetohora (plavo) kojem se može mijenjati širina. Sivom bojom je prikazan broj motora na plus-kraju pojedinih mikrotubula.

Nakon što je ustanovljeno da ovaj model oscilacija kinetohora ima dobro ponašanje, bilo je moguće krenuti s daljnjom analizom rezultata. Međutim, simulacija se odvijala relativno sporo jer je bilo moguće dobiti podatke tek nakon vizualnog prikaza sustava za pojedini vremenski korak – što je za ovaj sustav od šest mikrotubula podrazumijevalo i višednevno čekanje na krajnje rezultate.

Stoga je napravljen novi program koji je kreirao objekte (N mikrotubula i dvije kinetohore), računao položaj za svaki vremenski korak dt, te ispisivao ukupan broj oscilacija za sve promatrane vrijednosti parametara.

Zbog same jednostavnosti programa, bilo je moguće računati položaje sustava od šest mikrotubula, ali isto tako i za sustav od 24 mikrotubula bez nekih većih poteškoća.

Prije samog izvođenja simulacije bilo je potrebno provjeriti kakav utjecaj na vjerojatnost katastrofe i spasa P_{cat} i P_{res} imaju veličine koje se budu promatrale u parametarskom prostoru, f_c^{cat} i k_0^{catf}, te f_c^{res} i k_0^{res}, te da li se uopće radi o dobrom redu veličine.



Slika 3.2: Graf ovisnosti vjerojatnosti katastrofe P_{cat} o parametrima f_c^{cat} (a) i k_0^{catf} (b) i graf ovisnosti vjerojatnosti spasa P_{res} o parametrima f_c^{res} (c) i k_0^{res} (d).

Bilo je bitno provjeriti kako se ponaša vjerojatnost za navedene veličine kako bi se vidjelo da li se uopće može očekivati promjena ponašanja sustava u parametarskom prostoru (slika 3.2).

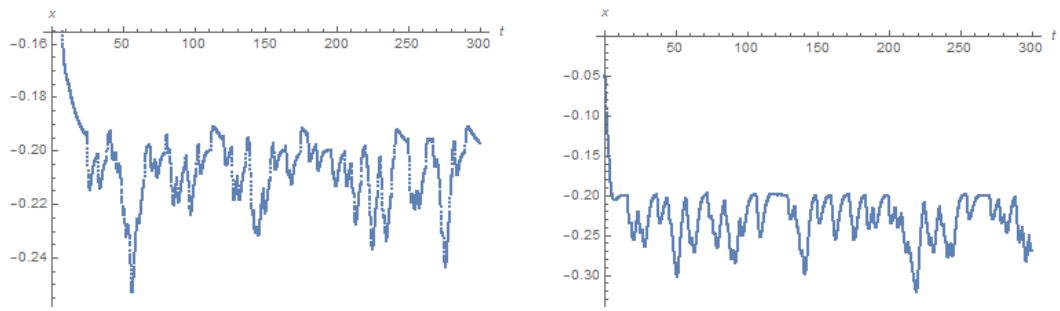
Ovisno o sustavu, sestrinske kinetohore imaju dva tipa ponašanja – prisutnost ili odsutnost oscilacija oko metafazne ravnine. Cilj je pokazati za koje vrijednosti parametara f_c^{cat} i k_0^{catf}, te f_c^{res} i k_0^{res} oscilacije iščezavaju, a za koje vrijednosti su prisutne.

Na taj način se prvo opisuje kvantitativni model dinamike kinetohora i mikrotubula preko ravnoteže sila. Nakon toga se prikazuje kako izgleda ponašanje maksimalno pojednostavljenog nefizikalnog modela u kojemu nema jednadžbi gibanja, nego postoje samo oscilacije oko položaja spajanja kinetohore i mikrotubula. Cilj je vidjeti da li tako pojednostavljeni model može reproducirati rezultate fizikalnog modela.

3.1 Simulacija s fizikalnim parametrima

Nakon što je napravljen model gibanja kinetohora i program koji ga simulira, bilo je moguće dobiti prikaz promjene vrijednosti svake veličine u nekom vremenu T. Podaci su zapisivali u datoteku, te prikazivali pomoću programskog paketa *Mathematica*.

Jedan od problema koji se pojavio je i točno definiranje koliko mora biti velika promjena položaja da bi se smatrala oscilacijom. U ovom radu je uzeto da je oscilacija svaki tip gibanja koji mijenja smjer i pritom je veći od $0.005\mu m$. Time je u oscilatorno gibanje uključen i veliki broj zanemarivo malih oscilacija, što je bilo potrebno kako bi se dobile bolje razlike prilikom promatranja parametarskog prostora i broja oscilacija.

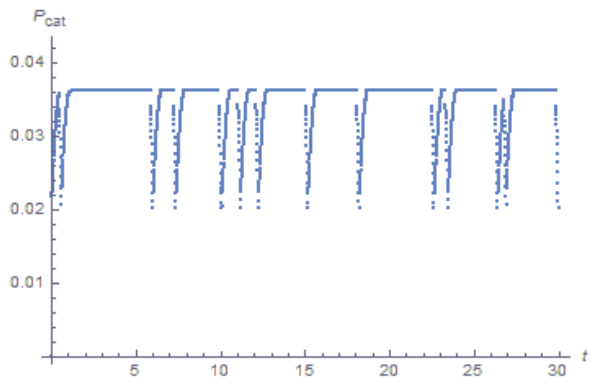


(a) (b)

Slika 3.3: Ovisnost srednjeg položaja kinetohora o vremenu za (a) $f_c^{cat} = 1$ i $k_0^{catf} = 1$, te za (b) $f_c^{cat} = 40$ i $k_0^{catf} = 40$.

Također se promotrilo kako se mijenja srednji položaj kinetohora s vremenom kako bi se dobio osjećaj kako izgledaju amplituda i frekvencija oscilacija za drugačije vrijednosti parametara f_c^{cat} i k_0^{catf} (slika 3.3). Može se primijetiti da za manje vrijednosti parametara imamo više oscilacija i manje amplitude, a za veće vrijednosti f_c^{cat} i k_0^{catf} amplituda je veća, ali je i broj oscilacija manji.

Bilo je moguće i provjeriti kako izgleda vjerojatnost da se dogodi katastrofa za promatrani mikrotubul – očekivano, vjerojatnost se povećava kako raste i mikrotubul (slika 3.4).

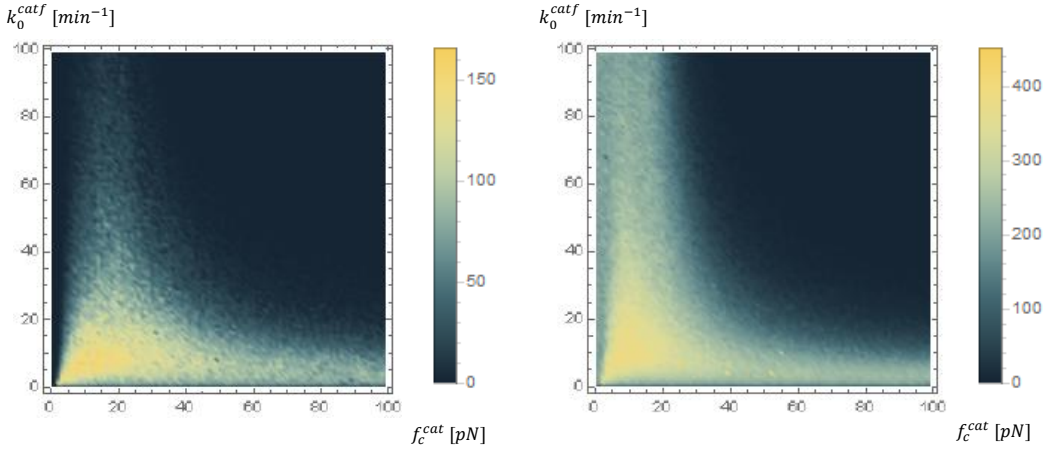


Slika 3.4: Prikaz promjene vjerojatnosti da se dogodi katastrofa za $f_c^{cat} = 1$ i $k_0^{catf} = 1$.

Jedan od glavnih ciljeva simulacije bio je provjeriti kako se ponaša sustav za različite vrijednosti parametara f_c^{cat} i k_0^{catf}, te za različite vrijednosti broja mikrotubula koji se nalaze u sustavu.

Sve veličine koje su dane u tablici 2.1 su relativno dobro poznate i izmjerene. No, pretpostavka da učestalosti katastrofe i spasa eksponencijalno ovise o silama polimerizacije i depolimerizacije još uvijek nije dovoljno istražena.

Iz tog razloga se promatra parametarski prostor upravo tih veličina, kako bi se moglo odrediti za koje vrijednosti f_c^{cat} i k_0^{catf}, te f_c^{res} i k_0^{res} imaju najbolje podudaranje sa stvarnim rezultatima.



(a) (b)

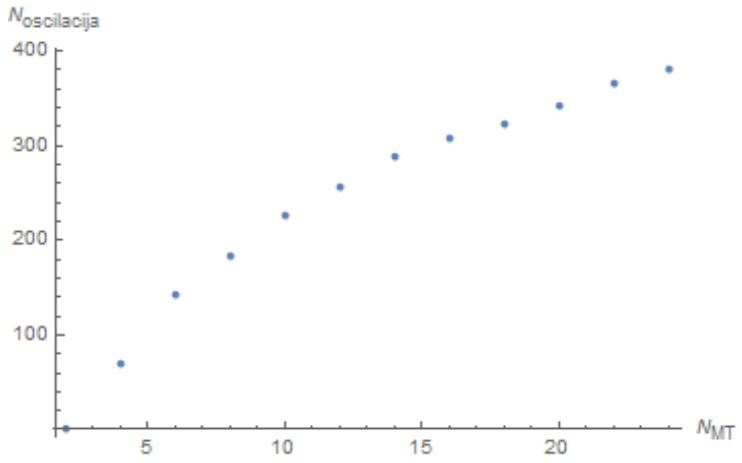
Slika 3.5: Prikaz promjene broja oscilacija u parametarskom prostoru za različite vrijednosti f_c^{cat} i k_0^{catf}. Na slici (a) je prikazan parametarski prostor za sustav od šest mikrotubula, dok je na slici (b) prikazan parametarski prostor za sustav od 24 mikrotubula.

Napravila se simulacija ponašanja biološkog sustava za sve vrijednosti parametara učestalosti katastrofe (slika 3.5). Za dobivanje jednog ovakvog grafa bilo je potrebno svega nekoliko minuta (za sustav od 6 mikrotubula), odnosno oko sat vremena (za sustav od 24 mikrotubula) izvođenja programa na računalu. S obzirom na relativno kratko vrijeme izvođenja i jednostavnost definiranja sustava pomoću izrade objekata, moguće je primijeniti ovaj program na rješavanje bilo kojeg problema gdje postoje dobro definirane jednadžbe gibanja za svaki objekt koji se promatra.

Primjećuje se da najviše oscilacija postoji za $f_c^{cat} \approx 10pN$ i $k_0^{catf} \approx 10min^{-1}$ za oba sustava. Međutim, sustav s manje mikrotubula ne pokazuje oscilatorno ponašanje za sve promatrane vrijednosti k_0^{catf}, dok za sustav s 24 mikrotubula očekivano postoje oscilacije i za neke vrijednosti parametara k_0^{catf} i f_c^{cat} za koje oscilacije ne postoje u sustavu sa manjim brojem mikrotubula.

Može se primijetiti i da maksimalni broj oscilacija očekivano raste s brojem mikrotubula koji se nalaze u promatranom sustavu.

Kako bi se dobili detaljniji podaci o oscilacijama za različite brojeve parova mikrotubula, izvršilo se 1000 simulacija oscilacija za sve vrijednosti f_c^{cat} i k_0^{catf} i za svaki broj parova mikrotubula. Iz faznog prostora su uzete maksimalne vrijednosti broja oscilacija kako bi se mogla usporediti njihova prosječna vrijednost za svaki sustav (slika 3.6).

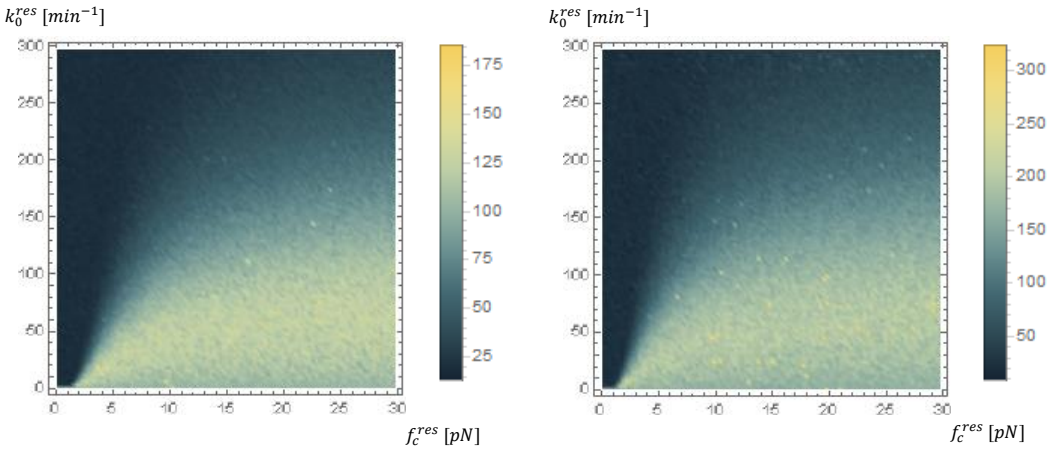


Slika 3.6: Prikaz prosječne vrijednosti broja oscilacija u ovisnosti o broju mikrotubula koji se nalaze u promatranom sustavu.

Može se primijetiti očekivani rast broja oscilacija s brojem mikrotubula u sustavu. Međutim, za $N_{MT} = 2$ nije se dogodila niti jedna oscilacija, te se može zaključiti da model ipak ne pokazuje dobro ponašanje za sustave s manjim brojem mikrotubula.

Zatim se promatralo na koji način se ponaša sustav za različite vrijednosti parametara f_c^{res} i k_0^{res}.

Jedna od poteškoća koja se pojavila prilikom izvođenja simulacije je ta da se spas mikrotubula može dogoditi samo ako je mikrotubul u stanju smanjivanja nakon što je doživio katastrofu. Zbog toga su se za vrijednosti f_c^{cat} i k_0^{catf} uzele vrijednosti za koje postoji najveća vjerojatnost katastrofe, kako bi učestalost spasa najviše došla do izražaja.



(a) (b)

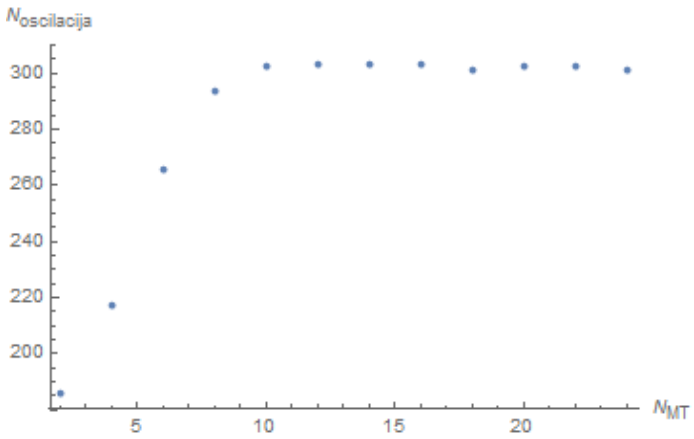
Slika 3.7: Prikaz promjene broja oscilacija u parametarskom prostoru za različite vrijednosti f_c^{res} i k_0^{res}. Na slici (a) je prikazan parametarski prostor za sustav od dva mikrotubula, dok je na slici (b) prikazan parametarski prostor za sustav od 24 mikrotubula.

Parametarski prostor izgleda isto za oba sustava – jedina razlika je u izoliranim područjima maksimuma oscilacija (slika 3.7), koja se za sustav sa dva mikrotubula mnogo rjeđe pojavljuju nego za sustav od 24 mikrotubula.

Također se primjećuje porast u broju oscilacija za sustav s više mikrotubula. Kako bi se bolje promotrilo takvo ponašanje, analizira se ponašanje sustava za različite vrijednosti parametara f_c^{res} i k_0^{res}, te za različite vrijednosti broja mikrotubula koji se nalaze u sustavu (slika 3.8).

Može se primijetiti da za razliku od parametara katastrofe, promjena parametara spasa i broja mikrotubula daje oscilacije za svaki sustav – čak i ako postoje samo dva mikrotubula.

Međutim, promjena broja oscilacija, a time i izgleda parametarskog prostora postoji samo za prvih nekoliko parova mikrotubula – nakon toga je broj oscilacija približno jednak za svaki sustav.



Slika 3.8: Prikaz prosječne vrijednosti broja oscilacija u ovisnosti o broju mikrotubula koji se nalaze u promatranom sustavu.

Cilj je bio pokazati da je sa samo nekoliko pojednostavljenih fizikalnih svojstava moguće dobiti mehanizam pomoću kojeg mikrotubuli vezani za istu kinetohoru mogu voditi metafazno gibanje kromosoma. Međutim, ravnoteža sila je vrlo vjerojatno samo dio mehanizma koji kontrolira gibanje kromosoma tijekom mitoze.

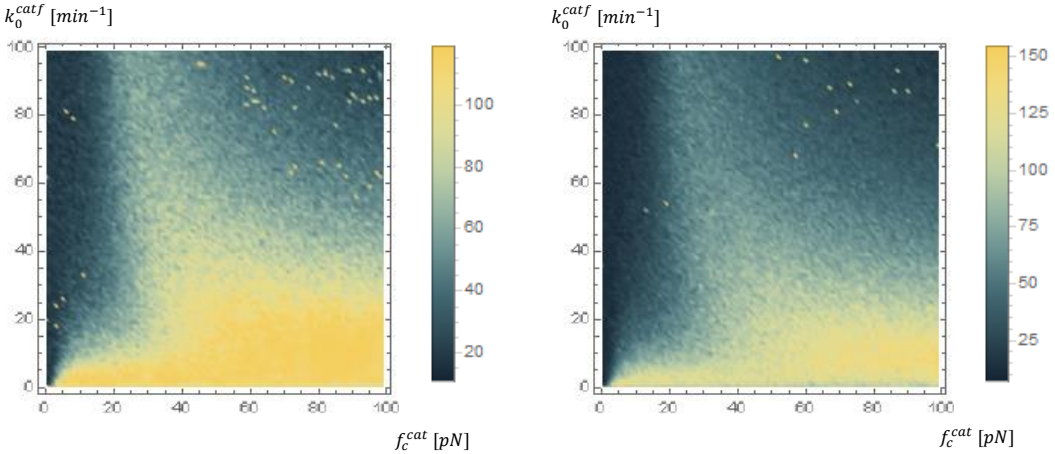
Postoji mnogo različitih vrsta stanica koje su programirane za izvođenje različitih bioloških funkcija. Međutim, kako učestalost katastrofe i spasa, a time i veličine f_c^{cat} i k_0^{catf}, te f_c^{res} i k_0^{res} nisu skroz istražene, moguće je prilikom budućih eksperimentalnih istraživanja odrediti broj oscilacija za određeni vremenski period, te iz parametarskog prostora odrediti za koje vrijednosti f_c^{cat} i k_0^{catf}, te f_c^{res} i k_0^{res} imaju najbolje podudaranje sa stvarnim rezultatima.

3.2 Minimalna simulacija oscilacija kinetohora

S ciljem reprodukcije rezultata fizikalnog modela, napravljene su simulacije za parametarski prostor minimalnog modela oscilacija kinetohora u kojemu nema jednadžbi gibanja, nego postoje samo oscilacije oko položaja spajanja kinetohore i mikrotubula i na temelju toga se izračunava položaj kinetohore.

Izgled parametarskog prostora minimalnog modela (slika 3.9) ima veću koncentraciju maksimalnog broja oscilacija - za razliku od fizikalnog modela, gdje je maksimalni broj lokaliziran na jednom mjestu. Može se primijetiti i da model nema dobro definirane granice maksimalnog broja oscilacija, nego postoje točke u kojima postoje odstupanja od očekivanog broja oscilacija. Usprkos tome, moglo bi se reći da je uzevši u obzir sva pojednostavljenja modela, rezultat zadovoljavajući s obzirom na izgled parametarskog prostora.

Međutim, razlika u broju oscilacija nije toliko značajna kao u fizikalnoj simulaciji, te je ipak potrebno napraviti preinake modela kako bi davao bolje rezultate.

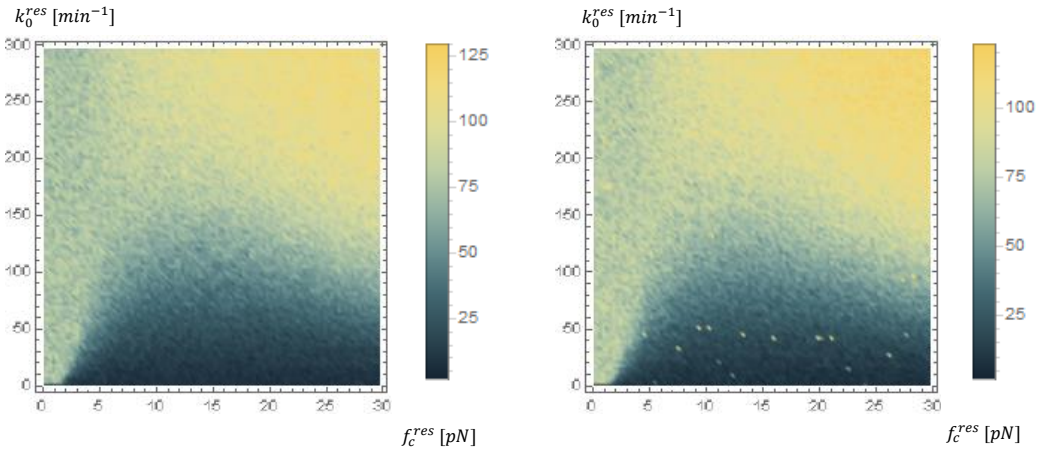


(a) (b)

Slika 3.9: Prikaz promjene broja oscilacija u parametarskom prostoru za različite vrijednosti f_c^{cat} i k_0^{catf}. Na slici (a) je prikazan parametarski prostor za sustav od šest mikrotubula, dok je na slici (b) prikazan parametarski prostor za sustav od 24 mikrotubula.

Prilikom računanja broja oscilacija za parametre učestalosti spasa, dobiveni graf (slika 3.10) izgleda potpuno drugačije od onoga dobivenog fizikalnom simulacijom – gotovo je inverzan.

Razlika u broju oscilacija sustava s 2 i sustava s 24 mikrotubula ne samo da pokazuje krive vrijednosti, nego se dobiva da sustav s manjim brojem mikrotubula više oscilira. Iz toga se može zaključiti da minimalni pristup ipak nije dovoljno dobar da opiše na koji način se događaju promjene u promatranom biološkom sustavu.



Slika 3.10: Prikaz promjene broja oscilacija u parametarskom prostoru za različite vrijednosti f_c^{res} i k_0^{res}. Na slici (a) je prikazan parametarski prostor za sustav od dva mikrotubula, dok je na slici (b) prikazan parametarski prostor za sustav od 24 mikrotubula.

4. Zaključak

Oscilacije kinetohora koje se javljaju dok stanica provjerava ispravnost spajanja s mikrotubulima ovise o dinamici mikrotubula koja uključuje njihov rast i skraćivanje, a time i o specifičnim faktorima koji upravljaju vjerojatnošću da se mikrotubul nađe u stanju rasta ili skraćivanja. Cilj ovog istraživanja je bilo pokazati da je samo korištenjem ravnoteže sila moguće dobiti mehanizam pomoću kojeg mikrotubuli i kinetohore mogu voditi metafazno gibanje kromosoma.

Izradila su se dva modela oscilacija kinetohora - jedan fizikalni i jedan maksimalno pojednostavljeni. Motivacija za izradu pojednostavljenog modela je bila što brže izvođenje programa. Stoga se testiralo da li su maksimalno pojednostavljena pravila gibanja dovoljna za reprodukciju kompleksnog ponašanja dinamike kinetohora koje se odvija tijekom metafaze.

Nakon svih simulacija fizikalnog modela i pojednostavljenog modela gdje se pretpostavlja da specifični faktori vezani za kinetohore moraju upravljati MT dinamikom, može se reći da minimalni model ipak nije dovoljno dobro postavljen da reproducira fizikalni, što znači da za gibanje kinetohora nisu dovoljne samo vjerojatnosti spajanja i otpajanja mikrotubula s kinetohora.

Ovisno o sustavu, sestrinske kinetohore imaju dva tipa ponašanja – prisutnost ili odsutnost oscilacija oko metafazne ravnine. U ovom istraživanju se pokazalo i za koje vrijednosti parametara f_c^{cat} i k_0^{catf}, te f_c^{res} i k_0^{res} oscilacije iščezavaju, a za koje vrijednosti su prisutne, što bi se moglo primijeniti u budućim istraživanjima sustava mikrotubula i kinetohora.

Također, s obzirom na relativno kratko vrijeme simulacije oba modela i jednostavnost definiranja sustava pomoću izrade objekata, moguće je primijeniti ovaj program na rješavanje bilo kojeg problema gdje postoje dobro definirane jednadžbe gibanja za svaki objekt koji se promatra.

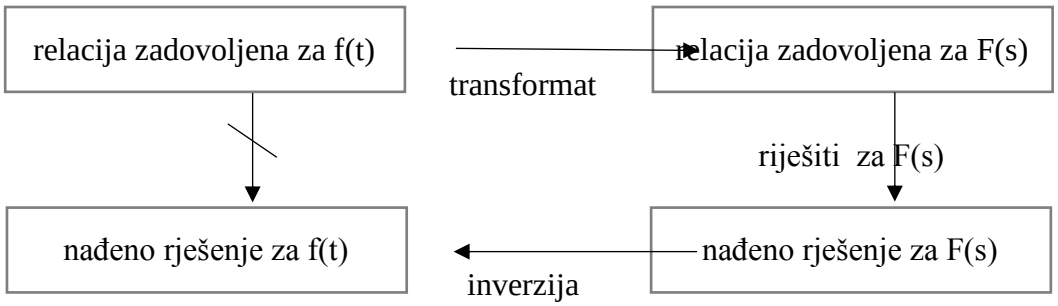
Na kraju je ostalo neodgovoreno najvažnije pitanje - zašto oscilacije zapravo postoje i čemu služe? Prijedlog je da postoje kako bi se napravila samoprovjera sustava i točnost ravnoteže sila. Moguće je i to da su oscilacije važne kako bi se provjerilo jesu li sve kinetohore ispravno spojene kako bi se izbjeglo zapetljavanje kromosoma, što bi pak imalo iznimno štetne posljedice za anafaznu separaciju kromatida.

Dodaci

Dodatak A: Analitičko rješenje gustoće motora na mikrotubulu

Laplaceov transformat daje alternativni opis koji pojednostavljuje proces analize ponašanja sustava. On se koristi u trenutku kada diferencijalne jednadžbe postaju komplicirane. Njegovo rješavanje može biti dosta teško, no i to je u mnogim slučajevima jednostavnija opcija od direktnog rješavanja diferencijalne jednadžbe. Laplaceov transformat je drugi najrašireniji tip transformata koji se koristi prilikom rješavanja fizikalnih problema. Koristan je posebno prilikom rješavanja linearnih diferencijalnih jednadžbi (primjerice, onih koje se javljaju prilikom analize strujnih krugova) [29].

Za jednostavnije diferencijalne jednadžbe nije potrebno koristiti Laplaceov transformat, jer bi rješavanje tom metodom bilo znatno teže od rješavana npr. metodom varijacije parametara.



Slika A.1: Pojednostavljeni prikaz rješavanja Laplaceovog transformata.

Laplaceov transformat je definiran na slijedeći način:

$$\mathcal{L}\{f(t)\} = \int_0^\infty f(t)e^{-st}dt$$

Model gustoće motora na mikrotubulu $\rho(x,t)$ je dan izrazom:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \alpha\Theta\left(v_g t - x\right) - \beta\rho - v_m \frac{\partial \rho}{\partial x}$$

Izraz je moguće riješiti analitički uz uvjete: $\rho(0,t)v_m = 0$, te $\rho(x,0) = 0$.

Prvi korak prilikom traženja rješenja $\rho(x,t)$ koje zadovoljava danu diferencijalnu jednadžbu je pronalazak Laplaceovog transformata (slika A.1). Za diferencijalnu jednadžbu vrijedi:

$$\mathcal{L}\left(\frac{\partial \rho}{\partial t}\right) = \mathcal{L}\left(\alpha\Theta\left(v_g t - x\right) - \beta\rho - v_m \frac{\partial \rho}{\partial x}\right)$$

Jedna od karakteristika Laplaceovog transformata je postojanje svojstva derivacije:

$$\mathcal{L}\left(\frac{\partial f(t)}{\partial t}\right) = s\mathcal{L}(f(t)) - f(0)$$

$$s\mathcal{L}(\rho) - \rho(x,0) = \alpha\mathcal{L}\left(\Theta\left(v_g t - x\right)\right) - \beta L(\rho) - v_m \frac{\partial L(\rho)}{\partial x}$$

Moguće je iskoristiti i još jedno svojstvo:

$$\mathcal{L}\left(\Theta(t-c)\right) = \frac{e^{-cs}}{s}$$

U ovom slučaju, Heaviside theta funkcija $\Theta\left(v_g t - x\right)$ se može zapisati i kao $\Theta\left(t - x/v_g\right)$ za slučaj da je $v_g > 0$. Za potrebe ovog modela, ta tvrdnja je uvijek ispunjena.

$$(s+\beta)\mathcal{L}(\rho) + v_m \frac{\partial L(\rho)}{\partial x} - \frac{\alpha\, e^{-\frac{xs}{v_g}}}{s} = 0$$

Dijeljenjem jednadžbe sa v_m, te uz pokrate $y = \mathcal{L}(\rho)$, $a = \frac{s+\beta}{v_m}$, $b = -\frac{\alpha}{sv_m}$, te $c = -\frac{s}{v_g}$ dobiva se jednadžba:

$$y' + ay + be^{cx} = 0$$

Ovo je linearna diferencijalna jednadžba prvog reda (dakle, oblika: $y' + p(x)y + g(x) = 0$), za koju je bilo moguće izvesti formulu za njeno opće rješenje. Jedini uvjet za pronalazak rješenja bio je da su funkcije $p(x)$ i $g(x)$ kontinuirane, što je ispunjeno u ovom slučaju.

Koristi se pretpostavka da postoji funkcija $\mu(x)$, odnosno faktor integracije. Diferencijalna jednadžba se zatim množi sa funkcijom $\mu(x)$, prvi i drugi članovi jednadžbe se zapisuju kao derivacija umnoška, te se dobiva $\left(\mu(x)y(x)\right)' = \mu(x)g(x)$. Iz ovog međukoraka je moguće integracijom dobiti opće rješenje diferencijalne jednadžbe:

$$y = \frac{\int \mu(x)g(x)dx + C_1}{\mu(x)}$$

Veličina C_1 označava konstantu integracije. Ukoliko se poslužimo formulom za izračun faktora integracije:

$$\mu(x) = e^{\int a dx} = e^{a}$$

te uz poznati $g(x)$, dobiva se da je:

$$\int \mu(x) q(x) dx = \int e^{ax}(-be^{cx}) dx = -\frac{b}{a+c} e^{(a+c)x}$$

Uvrštavanjem a, b i c u izraz za $y(x)$, dobiva se izraz za Laplaceov transformat veličine ρ:

$$\mathcal{L}(\rho) = C_1 e^{-\frac{s+\beta}{v_m}x} + \frac{\alpha}{s} \frac{v_g}{\beta v_g + s(v_g - v_m)} e^{-\frac{s}{v_g}x}$$

Za slučaj $v_m > 0$, iz početnih uvjeta proizlazi $\rho(0,t) = 0$, što vodi na jednadžbu $\mathcal{L}(\rho(0,t)) = 0$

Znači, za vrijednost $x = 0$ moguće je izračunati vrijednost konstante C_1:

$$C_1 = -\frac{\alpha}{s} \frac{v_g}{\beta v_g + s(v_g - v_m)} e^{-\frac{s}{v_g}x}$$

Laplaceov transformat sada se može jednostavnije zapisati kao:

$$\mathcal{L}(\rho) = C_1 e^{-\frac{s+\beta}{v_m}x} + C_1 e^{-\frac{s}{v_g}x}$$

Ovo je završni korak prvog dijela prilikom traženja rješenja diferencijalne jednadžbe.

Slijedeći korak u procesu rješavanja transformata je invertiranje Laplaceovog transformata kako bi se pronašlo rješenje $\rho(x,t)$:

$$\rho = \mathcal{L}^{-1}\left(C_1 e^{-\frac{s+\beta}{v_m}x} - C_1 e^{-\frac{s}{v_g}x}\right)$$

Laplaceov transformat ima svojstvo linearnosti, odnosno, za njega vrijedi:

$$\mathcal{L}^{-1}(af + bf) = a\mathcal{L}^{-1}(f) + b\mathcal{L}^{-1}(f)$$

Ukoliko se svojstvo linearnosti direktno primjeni na jednadžbu za ρ, dobiva se izraz:

$$\rho = -\alpha v_g e^{-\frac{\beta x}{v_m}} \mathcal{L}^{-1}\left(\frac{1}{s} \frac{1}{\beta v_g + s(v_g - v_m)} e^{-\frac{sx}{v_m}}\right) + \alpha v_g \mathcal{L}^{-1}\left(\frac{1}{s} \frac{1}{\beta v_g + s(v_g - v_m)} e^{-\frac{sx}{v_g}}\right)$$

Može se primijetiti da se oba transformata razlikuju samo u eksponencijalnoj funkciji – odnosno, vrijednostima v_m i v_g.

Rješava se izraz za jedan inverzni transformat:

$$\mathcal{L}^{-1}\left(\frac{1}{s}\frac{1}{\beta v_g + s(v_g - v_m)}e^{-\frac{sx}{v_g}}\right)$$

Ukoliko se uvedu pokrate: $c = x/v_m$, te $a = \beta v_g/2(v_g - v_m)$ prethodni izraz se može svesti na:

$$\frac{1}{a(v_g - v_m)}\mathcal{L}^{-1}\left(e^{-cs}\frac{a}{(s+a)^2 - a^2}\right)$$

Laplaceov transformat ima mnoga svojstva koja ga čine korisnim pri rješavanju nekih problema. Najznačajnija prednost je to što deriviranje i integriranje postaju množenje i dijeljenje s veličinom s. Mnoga svojstva transformata je jednostavno moguće iščitati iz tablica, na primjer [29]:

$$\mathcal{L}\big(\Theta(t-c)\, f(t-c)\big) = e^{-cs}F(s)$$

$$\mathcal{L}\big(e^{at}\, f(t)\big) = F(s-a)$$

Laplaceov transformat je linearan operator. Korištenjem tog svojstva, neki transformati se mogu dobiti direktno iz te definicije.

$$\mathcal{L}(\sinh(\omega t)) = \frac{\omega}{s^2 - \omega^2}$$

Sada je potrebno iz inverznog Laplaceovog transformata pronaći rješenje diferencijalne jednadžbe – i s time završava treći (i zadnji) korak prilikom procesa rješavanja transformata.

$$\mathcal{L}^{-1}\left(e^{-cs}\frac{a}{(s+a)^2 - a^2}\right) = \Theta(t-c)\, e^{-a(t-c)}\, sinh[a(t-c)]$$

Uvrštavanjem u izraz za ρ, napokon se dobiva rješenje diferencijalne jednadžbe, odnosno analitičko rješenje za gustoću motora na mikrotubulu:

$$\rho(x,t) = \frac{\alpha}{\beta}\left[\Theta\big(v_g t - x\big)\left(1 - e^{\frac{x - v_g t}{v_g - v_m}\beta}\right) - \Theta(v_m t - x)\left(e^{\frac{-x}{v_m}\beta} - e^{\frac{x - v_g t}{v_g - v_m}\beta}\right)\right]$$

Taj izraz korišten je za usporedbu s numeričkim rješenjem diferencijalne jednadžbe.

Dodatak B: Metoda konačnih razlika

Metoda konačnih razlika je numerička metoda rješavanja diferencijalnih jednadžbi. Vrlo je jednostavna, a algoritmi se mogu primijeniti na kompleksnije diferencijalne jednadžbe iz kojih je moguće naći rješenje diskretizacijom.

Uz pretpostavku da funkcija čiju derivaciju računamo ima lijepo ponašanje, moguće je napraviti razvoj u red:

$$f(x_0 + h) = f(x_0) + \frac{f^{(1)}(x_0)}{1!}h + \frac{f^{(2)}(x_0)}{2!}h^2 + \cdots + R_n(x)$$

Ovdje $R_n(x)$ označava razliku između Taylorovog reda stupnja n i originalne funkcije. Aproksimacija za prvu derivaciju se može zapisati i kao:

$$f(x_0 + h) = f(x_0) + h\, f'(x_0) + R_1(x)$$

Dijeljenjem funkcije sa h, te rješavanjem za $f'(x_0)$ dobiva se:

$$f'(x_0) \approx \frac{f(x_0 + h) - f(x_0)}{h}$$

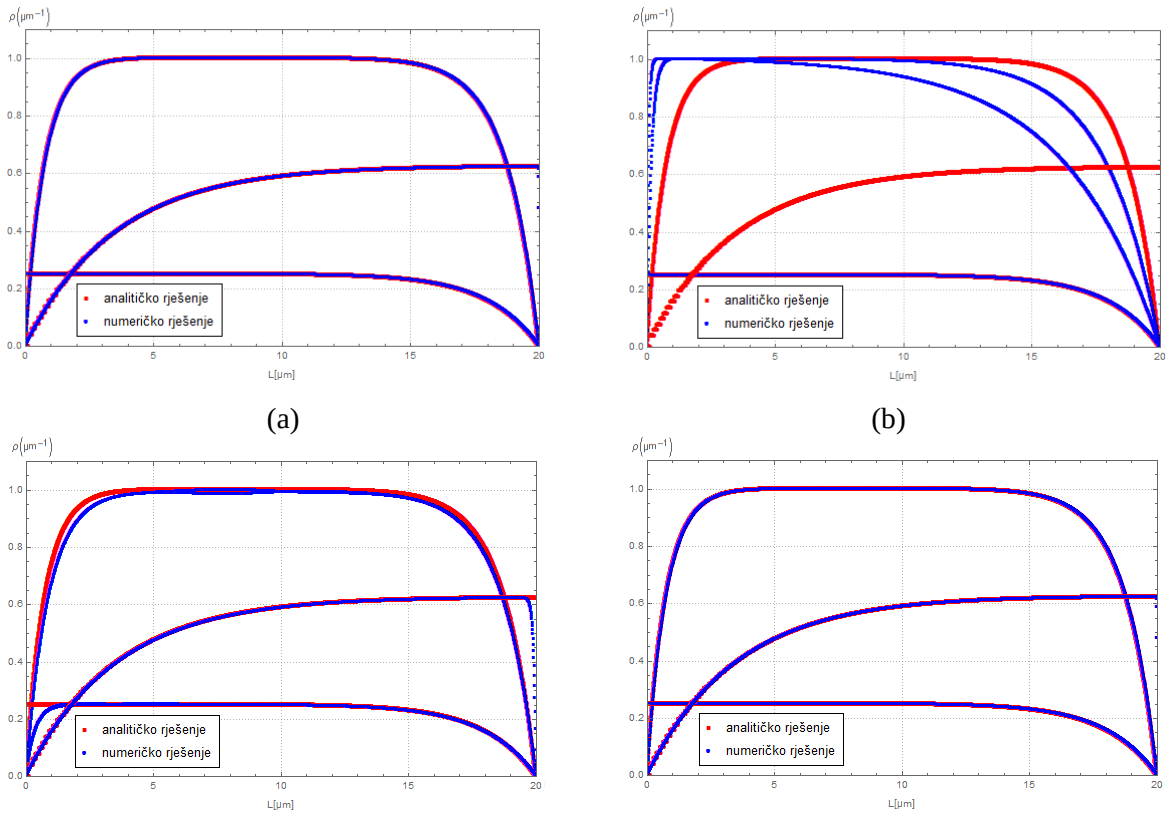
Ovdje se pretpostavilo da je $R_1(x)$ zanemarivo malen.

Na sličan način je moguće izvesti izraz za prvu derivaciju po vremenu, te prvu derivaciju po prostoru. Tako se može doći do *upwind* metode parcijalnog deriviranja [30]. Tom metodom se lako može izračunati derivacija u trenutku $n + 1$ eksplicitno iz vrijednosti koje je funkcija imala u trenutku n.

U ovom slučaju se vrijednost h za derivaciju po vremenu zapisuje kao dt, a za derivaciju po prostoru kao dx. Veličina n se odnosi na vremenski korak, a j na prostorni.

$$u_j^{n+1} = u_j^n - \frac{v_m dt}{dx}\left(u_j^n - u_{j-1}^n\right)$$

Na slici B.1 (a) je dana usporedba numeričkog i analitičkog rješenja za *upwind* metodu. Može se primijetiti vrlo dobro preklapanje funkcija.



(a) (b)

(c) (d)

Slika B.1: Usporedba numeričkog i analitičkog rješenja za (a) *upwind*, (b) FTCS, (c) Lax-Friedrichs i (d) Lax-Wendroff metodu numeričkog deriviranja. Za vrijednosti konstanta je uzeto: $\beta = 4min^{-1}$, $t = 2.5min$, $v_g = 8\ \mu m/min$. Na grafu su prikazana tri slučaja – kada je v_m manji ($v_m = 3\ \mu m/min$) i veći ($v_m = 14\ \mu m/min$) od v_g, te kada v_m iščezava ($v_m = 0\ \mu m/min$). Za ta tri slučaja također su uzete različite konstante α kako bi postojala razlika u amplitudama radi bolje preglednosti. $\alpha = 4\mu m^{-1}min^{-1}$, $\alpha = 2.5\mu m^{-1}min^{-1}$ te $\alpha = 1\mu m^{-1}min^{-1}$.

Još jedna metoda parcijalne derivacije se dobiva računanjem Taylorovog reda za $x_j \pm dx$. Oduzimanjem dva izraza, te dijeljenjem sa $2dx$ moguće je eliminirati član prvog reda. FTCS (*forward-time-centered-space*) metoda koristi aproksimaciju prvog reda za derivaciju po vremenu, te aproksimaciju drugog reda za prostornu derivaciju, te se dobiva:

$$u_j^{n+1} = u_j^n + \frac{v_m dt}{2\,dx}\left(u_{j+1}^n + u_{j-1}^n\right)$$

FTCS metoda nije stabilna – što znači da će numeričko rješenje nagomilavati greške u svakom koraku, te ne reproducira vjerne rezultate osim za vrlo maleni raspon vrijednosti. Zbog toga se FTCS metoda rijetko koristi.

Na slici B.1 (b) se može primijetiti vrlo dobro slaganje numeričkog i analitičkog rješenja kada veličina v_m iščezava, no što više v_m raste, to je manje preklapanje funkcija. Najgore slaganje imamo za $v_m = 14\ \mu m/min$, gdje funkcija ima skroz drugačiji oblik od očekivanog.

Rješenje problema stabilnosti s kojim se suočava FTCS metoda prvi su predložili Lax i Friedrichs. Ideja se sastoji na zamjeni člana u_j^n s njegovim prostornim prosjekom:

$$u_j^n = \frac{1}{2}\left(u_{j+1}^n + u_{j-1}^n\right)$$

što vodi na jednadžbu:

$$u_j^{n+1} = \frac{1}{2}\left(u_{j+1}^n + u_{j-1}^n\right) - \frac{v_m dt}{2\,dx}\left(u_{j+1}^n - u_{j-1}^n\right)$$

Lax-Friedrichs metoda je uvjetno stabilna. Uvedena korekcija je ekvivalentna uvođenju numeričke disipacije – zapisivanjem jednadžbe tako da oduzmemo jednadžbu s lijeve i s desne strane sa u_j^n. Disipativni član teži nuli kako smanjujemo korak, te algoritam konvergira dobrom rješenju funkcije. Greška se javlja ukoliko je korak relativno velik. U tom slučaju dolazi do smanjenja amplitude.

Na slici B.1 (c) se može primijetiti relativno dobro slaganje analitičkog i numeričkog rješenja. Također, u ovom slučaju je primijećen trend opadanja preciznosti na rubovima funkcije – odnosno, analitičko i numeričko rješenje se sve više razlikuju zbog spomenute disipacije.

Za vrijednost koraka dx je uzeta vrlo mala veličina, odnosno $dx = 0.01$. Usporedbom navedenih numeričkih metoda, Lax-Friedrichs u odnosu na *upwind* i FTCS ima određenu manu, a to je da točnost jako ovisi o veličini koraka. Tamo gdje su *upwind* i FTCS imale vrlo precizne izračune za vrlo velike korake, Lax-Friedrichs je davao mnogo manje amplitude.

Zadnja metoda parcijalne derivacije koja se razmatrala je Lax-Wendroff metoda, koja se izvodi iz Lax-Friedrichs metode. Zbog toga je također moguća disipacija amplitude, iako ne u tolikoj mjeri.

Lax-Wendroff metoda glasi:

$$u_j^{n+1} = u_j^n - \frac{v_m dt}{2\,dx}\left(u_{j+1}^n - u_{j-1}^n\right) + \frac{v_m dt}{2\,dx}\left(u_{j+1}^n - 2u_j^n + u_{j-1}^n\right)$$

Na slici B.1 (d) je dana usporedba analitičkog i numeričkog rješenja navedene metode, te se može primijetiti njihovo dobro podudaranje.

Što se tiče korištenja pojedinih metoda prilikom rješavanja diferencijalne jednadžbe po kojoj se modeliralo ponašanje motora na mikrotubulima, važno je napomenuti da su se koristile isključivo Lax-Wendroff i *upwind* metoda. Obje metode su prilikom istovremenog prikazivanja na grafovima davale minimalna odstupanja, te su se pokazale najboljim izborom za ovaj tip derivacije.

Literatura

[1] Howard, J. Mechanics of motor Proteins and the Cytoskeleton: Sinauer Associates, Inc., 2001.

[2] Tubulin protein and microtubules, The Cytoskeleton - Oregon State University, http://oregonstate.edu/instruction/bi314/summer09/cytoskel.html, 28.03.2017.

[3] Banigan, E.J.; Chiou, K.K.; Ballister, E.R.; Mayo, A.M.; Lampson, M.A.; Liu, A.J. Minimal model for collective kinetochore–microtubule dynamics // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. Vol. 112, 41 (2015), str. 12699-704.

[4] Gay, G.; Courtheoux, T.; Reyes, C.; Tournier, S.; Gachet, Y. A stochastic model of kinetochore–microtubule attachment accurately describes fission yeast chromosome segregation // The Journal of Cell Biology. Vol. 196(6) (2012), str. 757–774.

[5] Spindle apparatus, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Spindle_apparatus, 28.03.2017.

[6] Amaro, A.C.; Samora, C.P.; Holtackers, R.; Wang, E.; Kingston, I.J.; Alonso, M.; Lampson, M.; McAinsh, A.D.; Meraldi, P.; Molecular control of kinetochore-microtubule dynamics and chromosome oscillations. // Nature Cell Biology 12 (2010), str. 319–329.

[7] Nédélec, F.; Surrey, T.; Maggs, A. Dynamic concentration of motors in microtubule arrays // Physical Review Letters. Vol. 86(14) (2001), str. 3192-3195.

[8] Vogel, S.K.; Pavin, N.; Maghelli, N.; Jülicher, F.; Tolić-Nørrelykke, I.M. Microtubules and motor proteins: Mechanically regulated self-organization in vivo. // The European Physical Journal Special Topics. Vol. 178 (2009), str. 57-69.

[9] Molecular Motors, ResearchGate, https://www.researchgate.net/publication/10799607_Molecular_Motors, 28.03.2017.

[10] Burroughs, N.J.; Harry, E.F.; McAinsh, A.D. Super-resolution kinetochore tracking reveals the mechanisms of human sister kinetochore directional switching // eLife, Vol. 4 (2015) e09500.

[11] What is Mitosis, Bioexplorer, http://www.bioexplorer.net/divisions_of_biology/cell_biology/mitosis/, 28.03.2017.

[12] Rieder, C.L. The structure of the cold-stable kinetochore fiber in metaphase PtK1 cells. // Chromosoma Vol. 84 (1981), str. 145–158.

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

[14] Chromosome, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/DNA, 28.03.2017.

[15] Meraldi, P. Keeping kinetochores on track. // European Journal of Cell Biology. Vol. 91 (2012) str. 103-106.

[16] Przewloka, M.R.; Glover, D.M. The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. // Annual Review of Genetics. Vol. 43 (2009), str. 439–465.

[17] Meraldi, P.; McAinsh, A.D.; Rheinbay, E.; Sorger, P.K. Phylogenetic and structural analysis of centromeric DNA and kinetochore proteins. // Genome Biology. Vol. 7 (2006), R23.

[18] Spindle checkpoint, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Spindle_checkpoint, 28.03.2017.

[19] Rieder, C.L.; Davison, E.A.; Jensen, L.C.; Cassimeris, L.; Salmon, E.D. Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. // The Journal of Cell Biology. Vol. 103 (1986), 581–591.

[20] Skibbens, R.V.; Skeen, V.P.; Salmon, E.D. Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push–pull mechanism. // The Journal of Cell Biology. Vol. 122 (1993), str. 859–875.

[21] Wan, X.; Cimini, D.; Cameron, L.A.; Salmon, E.D. The coupling between sister kinetochore directional instability and oscillations in centromere stretch in metaphase PtK1 cells. // Molecular Biology of the Cell. Vol. 23, 6 (2012), str.1035–1046.

[22] Gardner, M.K.; Odde, D.J.; Bloom, K. Kinesin-8 molecular motors: putting the brakes on chromosome oscillations // Trends in Cell Biology. Vol. 18, 7 (2008), str. 307-310.

[23] Mitchison, T.J. Chromosome alignment at mitotic metaphase: balanced forces or smart kinetochores? In Cell Movement, Volume 2: Kinesin, Dynein and Microtubule Dynamics // D.F. Warner and J.R. McIntosh, eds. (New York: Alan R. Liss), pp. 421–430. (1989).

[24] Mayr, M.I.; Hümmer, S.; Bormann, J.; Grüner, T.; Adio, S.; Woehlke, G.; Mayer, T.U. The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. // Current Biology. Vol. 17 (2007), str. 488–498.

[25] Tytell, J.D.; Sorger, P.K. Analysis of kinesin motor function at budding yeast kinetochores. // The Journal of Cell Biology. Vol. 172 (2006), str. 861–874.

[26] Civelekoglu-Scholey G.; He, B.; Shen, M.; Wan, X.; Roscioli, E.; Bowden, B.; Cimini, D. Dynamic bonds and polar ejection force distribution explain kinetochore oscillations in PtK1 cells. // The Journal of Cell Biology. Vol. 201(4) (2013) str. 577-593.

[27] Gardner, M.K.; Odde, D.J.; Bloom, K. Kinesin-8 molecular motors: putting the brakes on chromosome oscillations // Trends in Cell Biology. Vol. 18, 7 (2008), str. 307-310.

[28] Glunčić, M.; Maghelli, N.; Krull, A.; Krstić, V.; Ramunno-Johnson, D.; Pavin, N.; Tolić, I. M. Kinesin-8 Motors Improve Nuclear Centering by Promoting Microtubule Catastrophe. // Physical Review Letterss. Vol. 114 (2015)

[29] Butkov, E. Mathematical Physics, Addison-Wesley Publishing Company, St. John's University, New York 1973

[30] Rezzolla, L. - Numerical Methods for the Solution of Partial Differential Equations; Lecture Notes for the COMPSTAR School on Computational Astrophysics. Caen : France, 2011.