



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Fizički odsjek

Ivan Sigmund

**Teorijsko proučavanje uloge raspodjele
mikrotubula na dinamiku kromosoma
prilikom formiranja diobenog vretena**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Fizički odsjek

Ivan Sigmund

**Teorijsko proučavanje uloge raspodjele
mikrotubula na dinamiku kromosoma
prilikom formiranja diobenog vretena**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2025



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Physics

Ivan Sigmund

**Theoretical study of the role of
microtubule distribution on
chromosome dynamics during formation
of the mitotic spindle**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2025

Informacije o mentoru

Prof. dr. sc. Nenad Pavin rođen je 5. svibnja 1967. godine u Rijeci, Hrvatska. Upisao je diplomski studij fizike na Sveučilištu u Zagrebu, gdje je prvo stekao zvanje diplomiranog inženjera fizike 1993., a nakon toga postao magistar fizike 1998. godine. Potom je 1999. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Vladimira Paara obranio doktorsku disertaciju pod nazivom „Kaotični tranzijenti u novoj populacijskoj jednadžbi s rupom i njihov odraz na fraktalnu strukturu Arnoldovih jezika“.

Prof. dr. sc. Nenad Pavin započeo je svoju znanstvenu karijeru kao znanstveni novak na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je radio od 1993. do 2001. godine. Nakon toga, od 2001. do 2013. godine, bio je docent na istom odsjeku. U razdoblju od 2007. do 2011. godine radio je kao gostujući znanstvenik kod profesora Franka Jülichera na Max Planck institutu za fiziku kompleksnih sustava u Dresdenu, Njemačka. Istovremeno, od 2010. do 2011. godine, bio je gostujući znanstvenik kod Ive Tolić-Norrelykke na Max Planck institutu za staničnu molekularnu biologiju i genetiku. Od 2013. do 2019. godine bio je izvanredni profesor na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a od 2019. godine radi kao redoviti profesor na istom odsjeku.

Objavio je ukupno 58 radova, od kojih je 51 zastupljeno u Current Contents (CC), od kojih se može izdvojiti: Cell – 2 rada, Nature Cell Biology – 1 rad, Nature Communications – 3 rada, Developmental Cell – 2 rada, Physical Review Letters – 2 rada, PLoS Biology – 1 rad. Na 25 radova je glavni autor.

Pod njegovim stručnim vodstvom izrađeno je 9 doktorskih disertacija te 12 diplomskih radova. Izlagao je na više od 25 konferencija kao pozvani predavač. Bio je organizator 6 međunarodnih znanstvenih skupova. Kao voditelj ili suradnik, sudjelovao je u izvođenju niza projekata uključujući projekte koji se trenutno izvode: ERC Synergy „Molecular origins of aneuploidies in healthy and diseased human tissues (Aneuploidy)” (10.000.000 EUR), projekt Hrvatske zaklade za znanost (1.000.000 HRK), te projekt Znanstveni centar izvrsnosti za kvantne i kompleksne sustave te reprezentacije Liejevih algebri - *QuantXLie* (36.956.624,09 HRK).

Prof. dr. sc. Nenad Pavin dobitnik je brojnih nagrada i priznanja. Godine 2015. dobio je Državnu nagradu za znanost u području prirodnih znanosti. U 2019. godini nagrađen je Nagradom Europskog mikroskopijskog društva za izvrsne radove u kategoriji znanosti o životu, zajedno s prof. Ivom Tolić s Instituta Ruđer Bošković, za rad „The mitotic spindle

is chiral due to torques within microtubule bundles” koji je objavljen u prestižnom časopisu Nature Communications. Godine 2022. dobio je nagradu za znanstvenu djelatnost radnika u znanstvenim ili znanstvenonastavnim zvanjima. U 2024. godini izabran je za člana Europske organizacije za molekularnu biologiju (EMBO), čime je Hrvatska dobila svog osmog predstavnika.

Predavao je 8 predmeta na dodiplomskom studiju i 2 predmeta na poslijediplomskom studiju, te držao vježbe na nizu predmeta. Bio je voditelj doktorskog studija, polje Biofizika, te je bio zaslužan za razvoj i puštanje u rad novog studijskog programa "Profesori fizike i računarstva (2000.)", čiji je voditelj bio do 2005. godine.

Zahvale

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Nenadu Pavinu na predanom vodstvu kroz doktorski studij i na prenošenju svog znanstvenog entuzijazma. Neizmjerno sam zahvalan na prilici da učim od njega i razvijam potrebne vještine za znanstveni rad.

Veliko hvala dugujem prof. dr. sc. Ivi Tolić i dr. sc. Kruni Vukušiću na uvijek konstruktivnim raspravama i novim idejama kako približiti teoriju i eksperiment. Posebnu zahvalnost izražavam Domagoju Božanu za sve diskusije tijekom razvijanja modela i pisanja članka o kongresiji kromosoma. Iskreno se zahvaljujem i svim drugim kolegama iz Pavin i Tolić grupe koji su mi uljepšali vrijeme provedeno na fakultetu. Najdublje zahvale idu mojoj supruzi Chia-ying, koja mi je pružala bezuvjetnu podršku, mom sinu zbog kojeg sam uvijek davao sve od sebe, te cijeloj obitelji. Također bih htio zahvaliti svojoj majci i sestri što su često pomagali u čuvanju sina, kao i susjedi Maji Rogini i prijateljici Klari Popčević.

Na kraju hvala dragom Bogu koji je moj život na dobro izveo.

Ovaj je rad ne bi bio moguć bez financiranja od strane Europskog istraživačkog vijeća: ERC Synergy Grant, "Molecular origins of aneuploidies in healthy and diseased human tissues" (Aneuploidy), GA broj 855158.

Sažetak

Tijekom stanične diobe, genetski materijal se udvostručuje i organizira u kromosome, koji su nakon raspada jezgrine ovojnica raspoređeni po stanici. Kako bi se osiguralo pravilno dijeljenje stanice, kromosomi moraju biti transportirani do središnje ravnine vretena u procesu kongresije kromosoma. Za ovo kretanje zaslužno je diobeno vreteno, bipolarna struktura sastavljena od mikrotubula i pridruženih proteina, koja se počinje formirati na početku mitoze. Eksperimenti upućuju na postojanje više mehanizama koji doprinose kongresiji kromosoma, no do sada je nedostajala sustavna teorijska analiza sila uključenih u ovaj proces. U ovom doktorskom radu predstavljen je model koji se temelji na silama ovisnim o duljini preklopa mikrotubula. Motorni proteini u antiparalelnim preklopima stvaraju sile koje prenose kromosome prema središnjoj ravni vretena, pri čemu je jačina sile proporcionalna duljini preklopa. Istodobno, pasivni povezujući proteini u paralelnim preklopima generiraju sile koje ometaju kongresiju kromosoma. Ključno je da za izbor parametara koji odgovaraju ljudskim vretenima, kromosomi uspješno prilaze središtu vretena brzinom koja se podudara s mjernjima. Dodatno, izračuni su pokazali da se pod određenim uvjetima kromosomi mogu zadržavati na stabilnim pozicijama blizu polova, uz stabilnu poziciju u središtu, što objašnjava nastanak nepravilnih vretena s polarnim kromosomima. Ovaj rad pruža sveobuhvatan teorijski okvir za razumijevanje međudjelovanja komponenti vretena i nastanka sila koje upravljaju kongresijom kromosoma.

Ključne riječi: diobeno vreteno, kongresija kromosoma, mikrotubuli, sile ovisne o duljini, motorni proteini, pasivni povezujući proteini

Abstract

During cell division, genetic material is duplicated and organized into chromosomes, which are distributed throughout the cell after the breakdown of the nuclear envelope. To ensure proper cell division, chromosomes must be transported to the central plane of the spindle in the process of chromosome congression. This movement is facilitated by the mitotic spindle, a bipolar structure composed of microtubules and associated proteins, which begins to form after the nuclear envelope breakdown. Experiments suggest the existence of multiple mechanisms contributing to chromosome congression, but until now, a systematic theoretical analysis of the forces involved in this process has been lacking. This doctoral thesis presents a model based on forces dependent on microtubule overlap length. Motor proteins in antiparallel overlaps generate forces that transport chromosomes towards to the central plane of the spindle. Passive cross-linkers in parallel overlaps generate forces that oppose chromosome congression. Crucially, for parameter choices that correspond to human spindles, chromosomes successfully approach the spindle center at a speed consistent with measurements. Additionally, calculations have shown that, under certain conditions, chromosomes can be at stable positions near the poles, in addition to the stable position at the center, which explains the formation of irregular spindles with polar chromosomes. This work provides a comprehensive theoretical framework for understanding the interactions between spindle components and the generation of forces that govern chromosome congression.

Keywords: Mitotic spindle, length-dependent forces, chromosome congression, microtubules, motor proteins, passive cross-linkers

Extended abstract

Introduction

Cell division is fundamental for the reproduction of single-cell organisms and is essential for the growth, development, and tissue renewal in multicellular organisms. One of the key features of successful cell division is the precise distribution of duplicated genetic material, condensed into two sister chromatids, between two daughter cells. To ensure this precise distribution, at the beginning of mitosis, the cell generates forces that transport chromosomes from their initial random positions toward the future division plane in a process called congression. This chromosome movement occurs with the help of the mitotic spindle, a bipolar micromachine composed of microtubules and associated proteins, which assembles at the beginning of mitosis.

Microtubules, the main building units of the mitotic spindle, spontaneously polymerize, pause, and depolymerize within cells. They transition between these states in a stochastic process. Motor and non-motor proteins accumulate at overlapping regions between parallel and antiparallel microtubules in the spindle, and generate or transmit forces necessary for spindle function.

Forces directed toward the central plane of the mitotic spindle are crucial for chromosome congression, and several different mechanisms have been proposed in the literature to explain how these forces arise. First, polar-ejection forces occur when chromosome arms are pulled by motor proteins along microtubules extending from the poles, creating a force that pushes chromosomes away from the pole. Another source of force toward the spindle center comes from kinetochore motor proteins, such as CENP-E/kinesin-7, which move along non-kinetochore microtubules toward their plus ends.

Furthermore, a recent study showed that the connections between kinetochores and microtubules are crucial for chromosome congression, and in their absence, chromosomes do not approach the spindle center. For forces produced by microtubules attached to sister kinetochores to be directed toward the spindle center, the force toward the farther

pole must be greater than that toward the closer pole. There are two primary mechanisms by which microtubules attached to kinetochores generate the force required for chromosome congression. The first mechanism involves the length-dependent depolymerization or growth suppression of kinetochore-bound microtubules. Alternatively, recent research has demonstrated that longer microtubules can generate greater force by accumulating more motor proteins, which leads to a faster poleward movement of microtubules, termed poleward flux.

These studies indicate that multiple mechanisms concurrently contribute to chromosome congression. However, previous research has not systematically explored the mechanisms of chromosome congression involving forces generated by motor proteins accumulated along antiparallel microtubule overlaps, especially in relation to their dependence on microtubule distributions and their interaction with kinetochore motor proteins. To address this gap, in this work a comprehensive model is presented.

Model

In the model presented in this dissertation a one-dimensional model is used to describe the distribution of microtubules and forces arising from their interaction with kinetochores. These forces result from microtubule flux, which depends on their length and is a consequence of the accumulation of motor proteins, such as Eg5/kinesin-5, and cross-linkers, such as NuMA, along the microtubules. The model also includes forces generated by plus-end-directed kinetochore motor proteins, such as CENP-E. A key aspect of the model is the length-dependent force, where longer overlaps of antiparallel microtubules accumulate a greater number of motor proteins. For this reason, longer microtubules that are attached to the kinetochore from the distant pole can generate greater force than those from the near pole, thereby centering the chromosome. To estimate this force, it is necessary to calculate microtubule distributions. In this model it is achieved by using a mean-field approximation, where the microtubule distributions are described with a continuous function. Kinetochore microtubules and non-kinetochore microtubules are calculated separately, with each extending from poles or preexisting microtubules. Additionally, microtubules that are not bound to kinetochores are either growing or in a paused state. Since microtubule distributions are dynamically generated, they are calculated by taking into account known microtubule properties, including nucleation, growth, pause, and catastrophe.

Results

In this model, kinetochore movement is regulated by forces from motor proteins and passive cross-linkers on kinetochore microtubules, as well as kinetochore motor proteins. The distribution of these proteins depends on the system's geometry, including the number and average length of microtubules, complicating the analysis of individual protein contributions. To address this, the contributions of each protein are studied separately and in combination, providing a comprehensive understanding of their roles in ensuring proper chromosome congression. Model parameters were selected based on recent *in vitro* and *in vivo* measurements relevant to human cells.

Comparison of the distributions from the model and data from electron tomography and light-sheet microscopy experiments shows that the model's microtubule length distribution aligns well with experimental data, but the distribution of minus ends is more complex. Adjusting the nucleation distribution improves the model's fit. The distribution of growing plus ends from the model does not fully match experimental observations, suggesting the need to consider additional factors like proteins that limit microtubule growth. The basic model is used in further chapters, with the impact of minus end distribution changes discussed in a specific section.

Visualization of microtubule distribution od the basic model shows that the range of microtubules primarily depends on the average length of microtubules. The distribution shape changes according to the proportion of microtubules nucleated at poles relative to those nucleated along existing microtubules.

In the regime with only motor proteins, for parameters relevant to human spindles, kinetochores initially positioned near the left pole move approach the spindle equator zone in approximately 4 minutes, with an average kinetochore velocity of about $1 \mu\text{m}/\text{min}$. These predictions align with experimentally measured congression times and mean kinetochore velocities.

The quantitative agreement between theory and experiments suggests that length-dependent overlap forces generated by motor proteins can drive chromosome congression. Further investigation of the effects of motor proteins on kinetochore movement shows that motor proteins exert a net force toward the center under variations of all model parameters, including mean microtubule length.

Unlike motor proteins, passive cross-linkers cannot generate active forces on their own, but through their binding and unbinding, they create an effective friction force between connected objects. Thus, even when there are no motor proteins on kinetochore

microtubules, cross-linkers cause forces on kinetochore microtubules toward the pole due to constant non-kinetochore microtubule flux.

The equation of kinetochore motion with only passive cross-linkers on kinetochore microtubules takes the same form as the equation with only motor proteins, and kinetochores move toward the side with more passive cross-linkers. However, since passive cross-linkers accumulate in parallel overlaps while motor proteins accumulate in antiparallel overlaps, their distributions differ and thus differently affect chromosome congression.

Numerical calculations show that for biologically relevant microtubule lengths, kinetochores do not approach the spindle center. Instead, they asymptotically approach one of two stable points located near the poles, where the point approached depends on their initial position. It is also shown how the central point changes its stability depending on the average microtubule length, and while in the case of short microtubules, passive cross-linkers generate a force away from the center, in the case of long microtubules, they create a force toward the center.

When motor proteins and passive cross-linkers act simultaneously, for normal microtubule lengths, motor proteins overcome passive cross-linker forces and congression is possible. However, for smaller average microtubule lengths and depending on the ratio of motor protein to passive cross-linker densities, two stable points near the poles appear along with the one in the center, and kinetochores move toward one of them, depending on the initial position.

The model also shows that plus-end-directed kinetochore motor proteins assist in chromosome congression. They expand the phase space of possible ratios of motor protein to passive cross-linker densities where congression is possible.

Comparison with simple simulations of the attachment and detachment of kinetochore microtubules shows agreement with the main result, producing chromosome congression with motor proteins and cross-linkers. However, the waiting time for start of movement towards the center, observed in the simulations, is not directly reproducible with the mean-field approach.

Conclusion and discussion

In conclusion, this dissertation presents a model that describes the most important forces that occur during chromosome congression, and therefore represents an useful tool for studying this biological process. This model relies on the poleward flux of microtubules dependent on microtubule overlap length and describes the distributions of microtubules

in a mean-field approximation, allowing systematic exploration of parameter space and distinguishing the contributions of different mechanisms. While the mean-field approach successfully captures the main features of chromosome congression, it has limitations in describing certain dynamic aspects, such as the waiting time for movement initiation observed in simulations. Nevertheless, comparisons with simulations show good agreement of the main results, opening up possibilities for further investigation of cases where the mean-field approach shows limitations.

The presented model can also reproduce experimentally measured chromosome congression speeds and kinetochore dynamics, providing validation of its underlying assumptions. The framework provided in this work can be applied to address broader questions in cell biology, such as mitotic errors and chromosome segregation defects. For example, the model can be generalized for studying multipolar spindles, which occur in tumors, by taking into account microtubules that extend from different poles, thus positioning chromosomes on multiple equatorial plates. Beyond mitosis, the principles developed here could offer insights into other cellular processes where microtubule dynamics are crucial, such as in neurons, where the model could help understand growth and retraction of neurites.

In summary, the presented model demonstrates that microtubule overlap length-dependent forces generated by motor proteins can drive chromosome congression. This finding is supported by quantitative agreement with experimental data.

Sadržaj

1 Uvod	1
1.1 Biologija stanične diobe i diobenog vretna	1
1.1.1 Od otkrića do razumijevanja nutarnje strukture stanice	1
1.1.2 Građa diobenog vretna	3
1.1.3 Važnost ispravne kongresije kromosoma	5
1.1.4 Mehanizmi kongresije kromosoma	6
1.2 Fizikalna svojstva elemenata diobenog vretna	7
1.2.1 Fizikalna svojstva mikrotubula	7
1.2.2 Fizikalna svojstva motornih proteina	9
1.2.3 Sila pasivnih povezujućih proteina	15
1.3 Mehanika diobenog vretna i relevantni modeli	17
1.3.1 Modeli formiranja diobenog vretna	17
1.3.2 Modeli pozicioniranja kromosoma tijekom mitoze	18
2 Modeliranje sila odgovornih za kretanje kromosoma	20
2.1 Sile motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina	22
2.1.1 Jednadžbe gibanja kromosoma	22
2.1.2 Sile na desnoj kinetohori	22
2.1.3 Usklađeno gibanje mikrotubula smanjuje broj varijabli u modeliranju sila na kinetohore	25
2.2 Veza raspodjele mikrotubula i pridruženih proteina	26
2.2.1 Raspodjele nekinetohornih mikrotubula	26
2.2.2 Raspodjele kinetohornih mikrotubula	27
2.3 Ovisnost brzine kinetohora o raspodjeli motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina	28
3 Analitička rješenja modela	31
3.1 Parametri relevantni za ljudske stanice opravdavaju separaciju vremenskih skala	31
3.1.1 Raspodjela nekinetohornih mikrotubula	33
3.1.2 Raspodjela kinetohornih mikrotubula	34

4 Rezultati modela i usporedba s eksperimentima	37
4.1 Raspodjеле mikrotubula te njihovi preklopi	37
4.1.1 Usporedba raspodjela nekinetohornih mikrotubula s rezultatima elektronske i svjetlosne mikroskopije	37
4.1.2 Raspodjеле kinetohornih mikrotubula i pripadajući preklopi	39
4.2 Motorni proteini koji se nakupljaju se u preklopima mikrotubula pokreću kongresiju kromosoma	43
4.2.1 Motorni proteini pokreću kongresiju kromosoma	44
4.2.2 Učinkovitost centriranja ovisi o raspodjelama mikrotubula	46
4.3 Sile koje stvaraju pasivni povezujući proteini ometaju kongresiju kromosoma	49
4.3.1 Pasivni povezujući proteini imaju negativnu ulogu u centriranju kromosoma	49
4.3.2 Promjena stabilnosti centralne točke i pojava bifurkacije	51
4.4 Sile motornih proteina i povezujućih proteina određuju smjer kretanja kromosoma	52
4.4.1 Ovisno o duljini mikrotubula i gustoći povezujućih proteina mijenja se stabilnost centriranja	52
4.4.2 Udio polnih mikrotubula u vretenu određuje osjetljivost kongresije na promjenu omjera gustoće motornih i povezujućih proteina	55
4.4.3 Višestruke stabilne točke opažene u eksperimentima u skladu s teorijskim predviđanjima	56
4.4.4 Prilagođena raspodjela minus krajeva pozitivno utječe na kongresiju kromosoma	57
4.5 Kinetohorni motorni proteini usmjereni prema plus kraju pomažu kongresiji kromosoma	57
5 Kretanje kromosoma za diskretnu raspodjelu mikrotubula	60
5.1 Opis raspodjele kinetohornih mikrotubula master jednadžbom	60
5.2 Usporedba analitičkih rezultata i simulacija	62
6 Zaključak i diskusija	64
Dodaci	67
A Zanemarivanje inercijskog člana u gibanju kromosoma	67
B Jednadžbe modela za lijevu i desnu stranu diobenog vretena	67
C Prijelaz iz diskretnih raspodjela u kontinuirane raspodjelu mikrotubula	69
D Izračun vremenske promjene raspodjele nekinetohornih mikrotubula s pola	72
E Vremenska promjena broja mikrotubula na kinetohorama	73
F Proširenje modela raspodjela mikrotubula s obzirom na minus krajeve	74
G Analiza stabilnosti za kinetohore u blizini središnje ravnine vretena	77

Popis slika

1.1	Shematski prikaz kongresije kromosoma.	2
1.2	Flemmingovi crteži faza mitoze.	3
1.3	Dinamička nestabilnost mikrotubula vizualizirana kimografom.	4
1.4	Struktura diobenog vretena.	5
1.5	Rezultati teorijskih opisa mikrotubula	8
1.6	Izmjerene stope rasta i skraćivanja mikrotubula kao funkcija sile.	9
1.7	Utjecaj sile na brzinu rasta kinetohornog vlakna.	10
1.8	Mehanizam kretanja kinezina po mikrotubulima.	11
1.9	Brzina motornog proteina kinezin-1 kao funkcija sile.	15
1.10	Proteinsko trenje.	16
2.1	Shema jednodimenzionalnog modela kongresije kromosoma.	21
4.1	Usporedba raspodjela duljina mikrotubula dobivenih elektronskom mikroskopijom i modelom iz ovog rada.	38
4.2	Usporedba raspodjela minus krajeva mikrotubula dobivenih elektronskom mikroskopijom i modelom iz ovog rada.	39
4.3	Usporedba raspodjela plus krajeva rastućih mikrotubula dobivenih svjetlosnom mikroskopijom i modelima iz ovog rada.	40
4.4	Raspodjele kinetohornih i nekinetohornih mikrotubula i pripadajući preklopi za normalne parametre.	41
4.5	Raspodjele kinetohornih i nekinetohornih mikrotubula i pripadajući preklopi za kratke i duge mikrotubule.	42
4.6	Ovisnost raspodjela mikrotubula o omjeru broja mikrotubula nukleiranih na polu u odnosu na ukupan broj mikrotubula.	43
4.7	Motorni proteini pokreću kongresiju kromosoma.	44
4.8	Vremenski tijek prosječne duljine antiparalelnog preklopa i broja kinetohornih mikrotubula	45
4.9	Brzine kinetohora kao funkcije položaja	46
4.10	Brzina kongresije ovisi o prosječnoj duljini mikrotubula.	48
4.11	Ovisno o duljini mikrotubula, pasivni povezujući proteini proizvode sile koje se suprotstavljaju kongresiji kromosoma.	50
4.12	Međudjelovanje sila motornih proteina i povezujućih proteina regulira učinkovitost kongresije kromosoma.	53

4.13	Udio polnih mikrotubula u vretenu, α , određuje osjetljivost kongresije na promjenu omjera gustoće motornih i povezujućih proteina.	55
4.14	Brzina kinetohora kao funkcija položaja kinetohora za prilagođene raspodjele minus krajeva mikrotubula kao u Dodatku F i različite duljine mikrotubula.	56
4.15	Kongresija kromosoma sa samim kinetohornim motornim proteinima i u kombinaciji s drugim proteinima.	58
5.1	Usporedba rezultata pristupa srednjeg polja i simulacije.	62
1	Shematski prikaz promjene broja mikrotubula u danom intervalu duljine tijekom vremena Δt	70

Popis tablica

I	Parametri mikrotubula i kinetohora.	32
II	Parametri motornih i pasivnih povezujućih proteina.	33

1. Uvod

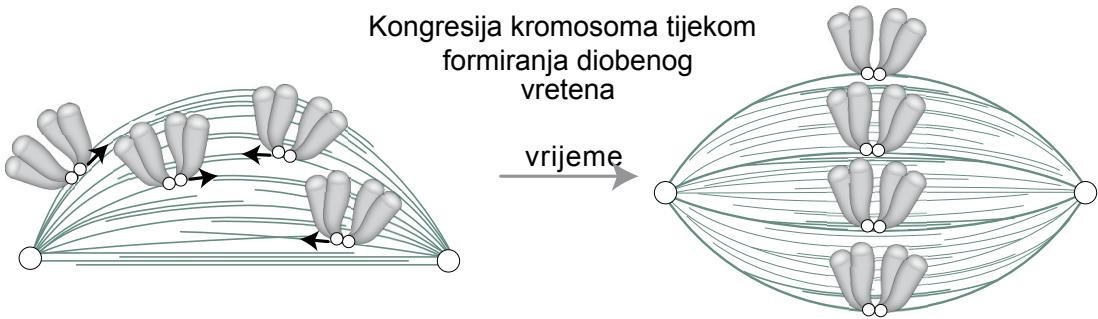
1.1 Biologija stanične diobe i diobenog vretena

Stanična dioba je temelj razmnožavanja jednostaničnih organizama, te je nužna za rast, razvoj i obnovu tkiva višestaničnih organizama [1]. Jedna od ključnih značajki uspješne stanične diobe je precizna raspodjela udvostručenog genetskog materijala, zgusnutog u dvije sestrinske kromatide, između dvije stanice kćeri. Kako bi se osigurala ova precizna raspodjela u prostoru i vremenu, na početku mitoze stanica proizvodi sile koje transportiraju kromosome od početnih nasumičnih pozicija prema budućoj ravnini dijeljenja u procesu koji se naziva kongresija [2–4], kao što je ilustrirano na slici 1.1. Međutim, za poznavanje građe stanice i sila unutar nje bio je potreban dug proces istraživanja koji se odvijao usporedo s razvojem mikroskopa, koji su omogućili pronicanje u tajne žive materije čija veličina ne prelazi nekoliko desetaka mikrometara (μm).

1.1.1 Od otkrića do razumijevanja nutarnje strukture stanice

Povijest razumijevanja stanice kao temeljne jedinice života seže u 17. stoljeće. Robert Hooke je 1665. godine, promatrajući presjek pluta mikroskopom, prvi put opisao sitne prostorije nalik saćama, koje je nazvao "stanicama" (cells) [5]. Ubrzo zatim, Anton van Leeuwenhoek otkrio je žive mikroorganizme [6]. Daljni napredak je pratio napredak u razvoju mikroskopa, te su tijekom 19. stoljeća Matthias Schleiden (1838.) i Theodor Schwann (1839.) utvrdili da su sve biljke i životinje građene od stanica [7, 8]. Walther Flemming je već 1880. godine detaljno opisao različite stadije staničnog ciklusa, kao što je prikazano na slici 1.2. Središnji fokus ovog rada, kongresija kromosoma, je prelaz iz stanja od početka prometafaze (Slika 1.2, Fig. 21) do metafaze (Slika 1.2, Fig. 22).

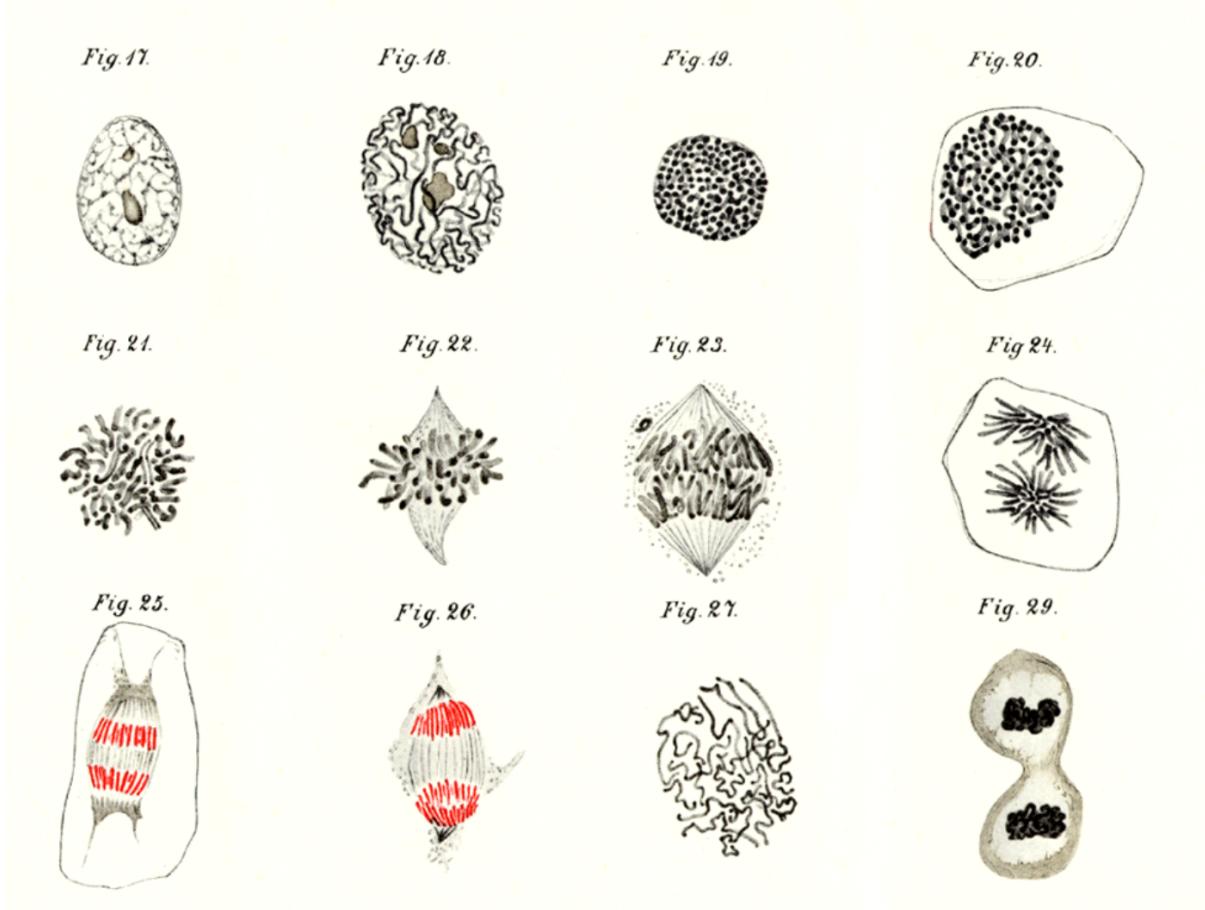
Napretkom mikroskopske tehnologije su usporedo napredovale i poznavanje građe diobenog vretena i teorijske spoznaje o silama koje utječu na pomicanje kromosoma. Već 1895. godine, Drüner je u svojem radu [10] razmatrao ulogu diobenog vretena tijekom



Slika 1.1: Shematski prikaz kongresije kromosoma tijekom formiranja diobenog vretena. Kromosomi kreću od početnih nasumičnih pozicija (lijeva shema) do ekvatora diobenog vretena (desna shema). Mikrotubuli (zelene linije) se protežu između polova diobenog vretena (bijeli krugovi) i međudjeluju s kinetohorama (bijeli krugovi na kromosomima). Crne strelice predstavljaju smjer kretanja kromosoma.

stanične diobe. Međutim, sama struktura diobenog vretena u to vrijeme nije bila u potpunosti razjašnjena. Naime, iako su pojedini istraživači vidjeli niti diobenog vretena u fiksiranom materijalu (primjerice Fig. 26 na slici 1.2), one nisu bile vidljive u živim stanicama. Stoga se sumnjalo da su uočene strukture zapravo artefakti nastali kao posljedica procesa fiksacije (za detaljniji pregled vidi [11]). Značajan napredak u razumijevanju strukture diobenog vretena ostvaren je kroz promatranja određenih živih stanica s izraženije vidljivim nitima (npr. u tablici VII u [12]). Nadalje, Chambers je 1917. godine [13] demonstrirao da se diobeno vreteno ponaša kao koherentna struktura kada je podvrgnuto torziji, rotaciji, pomicanju ili premještanju pomoću mikro-igle. Međutim, još 1937. godine Darlington [14] predlaže model uravnoveženog odbijanja, gdje polovi (centrosomi) odbijaju kromosome, ali ne spominje utjecaj diobenog vretena na taj fenomen. Nasuprot toga, Östergren je na temelju promatranja trivalenta (stanica s tri kinetohore) 1945. godine [15] predložio model u kojem polovi privlače kinetohore silom koja raste s udaljenosću. Unatoč ograničenim tehnološkim mogućnostima svoga doba, ovi rani konceptualni modeli donekle se slažu s današnjim spoznajama o tome kako se kromosomi pomiču u stanici.

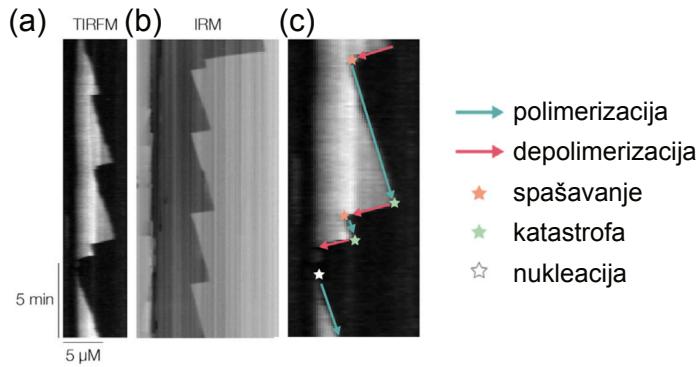
Važni doprinosi za poznavanje strukture stanice su došli korištenjem mikroskopije polariziranog svjetla [16, 17] i elektronske mikroskopije [18, 19]. Oni su dali konačni dokaz za postojanje niti diobenog vretena, otkrili postojanje mikrotubula i njihovo prijanjanje za kinetohore (npr. slika 12 u Ref. [20]).



Slika 1.2: Ilustracije različitih stadija stanične diobe prema Waltheru Flemmingu (1880.). Prikazani su različiti stadiji staničnog ciklusa, uključujući interfazu (Fig. 17-19), profazu (Fig. 20), prometafazu (Fig. 21), metaphazu (Fig. 22), anafazu i telofazu (Fig. 23-26), te citokinezu (Fig. 29). Slika preuzeta iz [9].

1.1.2 Građa diobenog vretena

Suvremena znanstvena paradigma smatra da je diobeno vreteno, bipolarni mikrostroj koji se sastavlja na početku mitoze, glavni pokretač pomicanja kromosoma tijekom mitoze [4, 22–24]. Glavna gradivna jedinica i temelj samoizgradnje diobenog vretena su mikrotubuli. Sastavljanje vretena oslanja se na dinamička svojstva mikrotubula, koji se unutar stanica spontano polimeriziraju (rastu), pauziraju i depolimeriziraju (skraćuju), te u stohastičkom procesu prelaze između tih stanja [25]. Prelaz iz polimerizacije u depolimerizaciju mikrotubula se zove katastrofa mikrotubula, dok se obrnuti prelaz naziva spašavanje. Vremenska evolucija duljine mikrotubula može se vizualizirati pomoću kimo-grafa, dijagrama koji nastaje slaganjem intenziteta fluorescencije duž jedne linije kroz više

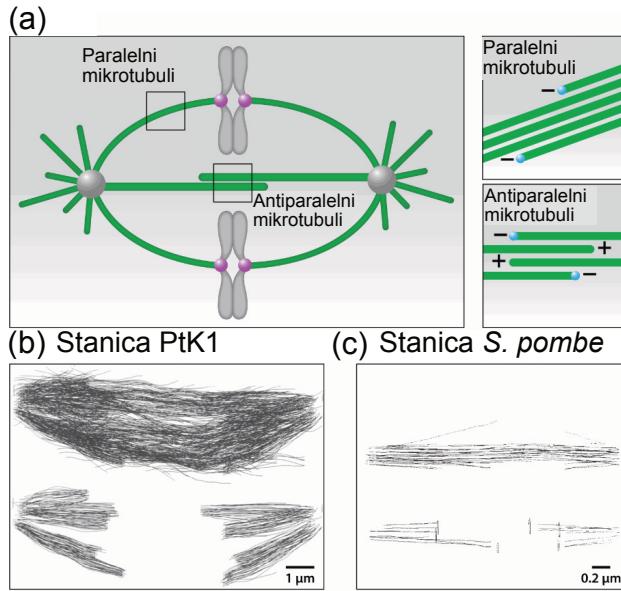


Slika 1.3: Dinamička nestabilnost mikrotubula vizualizirana kimografom. U kimografu horizontalna os predstavlja položaj duž mikrotubula, a vertikalna os predstavlja vrijeme koje teče od gore prema dolje. Svjetlije linije označavaju prisutnost mikrotubula, a njihov nagib odražava brzinu rasta odnosno skraćivanja. (a,b) Kimografi istog mikrotubula snimljeni dvjema komplementarnim tehnikama mikroskopije: (a) TIRFM (engl. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) koja detektira fluorescentno označene mikrotubule, i (b) IRM (engl. Interference Reflection Microscopy) koja omogućuje promatranje mikrotubula bez fluorescentnih markera. (c) Primjer kimografa jednog mikrotubula koji pokazuje faze rasta (zelena strelica), skraćivanja (crvena strelica), te trenutke spašavanja (narančasta zvjezdica), katastrofe (zelena zvjezdica) i nukleacije(bijela zvjezdica). Slika prilagođena iz [21]

vremenskih točaka (Slika 1.3).

Unutar diobenog vretena mikrotubuli započinju rast iz nukleacijskih proteinskih kompleksa, kao što je γ -TuRC, koji se nalaze na centrosomima i mogu se vezati za postojeće mikrotubule [26, 27]. Unutar vretena, mikrotubuli međusobno interagiraju tako da se u antiparalelnim i paralelnim preklopima mikrotubula nakupljaju motorni i nemotorni proteini, koji ih umrežavaju te prenose i generiraju sile [28–34]. Slika 1.4(a) shematski prikazuje gdje se u vretenu nalaze paralelni i antiparalelni preklopi mikrotubula. U slikama 1.4(b) i 1.4(c), koje su dobivene elektronskom mikroskopijom, vide se snimke raspodjele mikrotubula unutar diobenog vretena stanica štakora (*PtK1*) i stanica kvasca (*S. pombe*).

Rastući mikrotubuli mogu se prikvačiti na kinetohore, proteinski kompleks na kromosomima, te se takvi prikvačeni mikrotubuli nazivaju kinetohornim mikrotubulima [35]. Mikrotubuli koji nisu prikvačeni na kinetohore nazivaju se u ovom radu nekinetohornim mikrotubulima. U literaturi se često dalje dijele na astralne [36], interpolarne [37, 38] i premoščujuće [34, 39] mikrotubule, ovisno o njihovom položaju i ulozi.



Slika 1.4: Struktura diobenog vretena. (a) Shematski prikaz vretena koji prikazuje snopove mikrotubula (zeleno) koji se protežu od polova vretena (sive sfere). Kinetohorni mikrotubuli su pričvršćeni za kinetohore (ružičasto), proteinske komplekse na kromosomima (izduženi sivi oblici). Mikrotubuli koji se protežu s istog pola tvore paralelne preklope. Mikrotubuli koji se protežu sa suprotnih polova tvore antiparalelne snopove. Uvećani segmenti: paralelni snop i antiparalelni snop, s označenim plus (+) i minus (-) krajevima mikrotubula. Plave sfere označavaju mesta nukleacije mikrotubula. Slika prilagođena iz [22]. (b) Rekonstrukcija mikrotubula vretena iz elektronskih mikrografova stanica sisavaca PtK1 u ranoj anafazi. (Gore) Mikrotubuli vretena; (dolje) mikrotubuli povezani s devet kinetohora. Slika preuzeta iz [40]. (c) Rekonstrukcija mikrotubula vretena iz elektronskih mikrografova stanica kvasca *S. pombe*. (Gore) Mikrotubuli vretena; (dolje) kinetohorni mikrotubuli i kinetohore. Slika preuzeta iz [41].

1.1.3 Važnost ispravne kongresije kromosoma

Kongresija kromosoma, odnosno poravnavanje kromosoma u središnjoj ravnini diobenog vretena, ključna je za osiguravanje točne raspodjele genetskog materijala tijekom stanične diobe. Kongresija kromosoma ima nekoliko važnih uloga u osiguravanju točne raspodjele genetskog materijala, kako je istaknuto u Ref. [42]. Prvo, poravnavanje svih kromosoma u središnjoj ravnini diobe omogućuje da kromosomi nakon pucanja veze između sestrinskih kromatida započnu kretanje prema novim stanicama kćerima s iste pozicije. Nadalje, kongresija kromosoma povećava šanse da svaka kinetohora ima zahvaćen jednak broj mikrotubula s pripadajućeg pola, što osigurava jednake sile prema polovima. To je preduvjet nastavka mitoze radi zadovoljavanja kontrolne točke diobe (eng. spindle assembly checkpoint, skraćeno SAC) [43, 44]. Osim toga, ravnomjerna raspodjela sila prema dva pola

osigurava sinkronizirano kidanje veza između sestrinskih kromatida [45], a tenzija koju generiraju te sile stabilizira vezu između mikrotubula i kinetohora [46, 47]. Kada je kongresija završena i kromosomi su poravnati s metafaznom ravninom, mitoza se nastavlja iniciranjem segregacije kromosoma.

1.1.4 Mehanizmi kongresije kromosoma

Sile usmjerenе prema središnjoj ravnini diobenog vretena pokreću kongresiju kromosoma, a u literaturi je predloženo nekoliko različitih mehanizama kako bi se objasnilo počelo tih sile [42]. U skladu s Darlingtonovim razmatranjima, eksperimenti pokazuju da mikrotubuli koji se protežu od polova stvaraju silu koja gura kromosome od pola, poznatu kao sila polarnog izbacivanja (engl. Polar ejection forces, skraćeno PEF) [48–51]. Tu silu generiraju motorni proteini na krakovima kromosoma [52]. Drugi izvor sile prema središnjoj ravnini diobenog vretena su kinetohorni motorni proteini koji se kreću duž nekinetohornih mikrotubula prema njihovom plus kraju, poput CENP-E/kinezina-7 [53, 54].

Nadalje, nedavna studija pokazala je da kongresija kromosoma ovisi o vezama između kinetohora i mikrotubula i da u njihovoј odsutnosti kromosomi ne prilaze centru diobenog vretena [55]. Da bi sile proizvedene od mikrotubula prikvačenih na sestrinske kinetohore bile usmjerenе prema centru diobenog vretena, sila prema daljem polu mora biti veća od one prema bližem polu. Postoje dva glavna mehanizma kojima mikrotubuli prikvačeni na kinetohore proizvode silu potrebnu za kongresiju kromosoma. Prvi mehanizam temelji se na depolimerizaciji mikrotubula vezanih za kinetohore, što je pokazano *in vitro* i *in vivo* da proizvodi sile na kinetohore [56–59]. Sile ovisne o duljini mikrotubula proizvode se nakupljanjem većeg broja motornih proteina tipa kinezin-8 na plus kraju mikrotubula. U slučaju kvaščevih stanica, kinezin-8 potiče depolimerizaciju mikrotubula i posljedično povećava vučne sile na kinetohori na koju su vezani [60–62]. U ljudskim stanicama proteini kinezina-8 ne potiču depolimerizaciju, nego usporavaju rast duljih mikrotubula te tako ograničavaju kretanje kromosoma oko ekvatorijalne ravnine [63, 64]. Drugi mehanizam podrazumijeva da duži mikrotubuli generiraju veću silu zahvaljujući akumulaciji većeg broja motornih proteina, što rezultira bržim kretanjem prema polu. [65]. Sve ove studije sugeriraju da različiti mehanizmi istovremeno doprinose kongresiji kromosoma, te će u ovom radu biti istraženo kvanitativnim pristupom kako sile ovisne o toku mikrotubula utječu na kongresiju kromosoma.

1.2 Fizikalna svojstva elemenata diobenog vretena

Kako bi se razumjeli mehanizmi koji omogućuju kongresiju kromosoma, potrebno je prvo razmotriti fizikalna svojstva ključnih građevnih elemenata diobenog vretena - mikrotubula i proteina koji međudjeluju s njima. Mikrotubuli, kao rigidne proteinske cjevčice, osiguravaju mehaničku stabilnost diobenog vretena i služe kao "pruge" po kojima se kreću motorni proteini [66]. Motorni proteini pak generiraju sile potrebne za transport kromosoma kroz interakcije s mikrotubulima. U ovom poglavlju će biti predstavljena fizikalna svojstva mikrotubula i mehanizmi kojima motorni i pasivni povezujući proteini generiraju sile, što čini temelj za razumijevanje modela kongresije kromosoma koji će biti razvijen u ovom radu.

1.2.1 Fizikalna svojstva mikrotubula

Mikrotubuli su dugačke proteinske cjevčice izgrađene od heterodimera α - i β -tubulina [66]. Dimeri se slažu u protofilamente koji formiraju cilindrični mikrotubul promjera oko 25 nm. Na minus kraju mikrotubula nalazi se nukleacijski protein s γ -tubulinom.

Duljina ustrajnosti mikrotubula

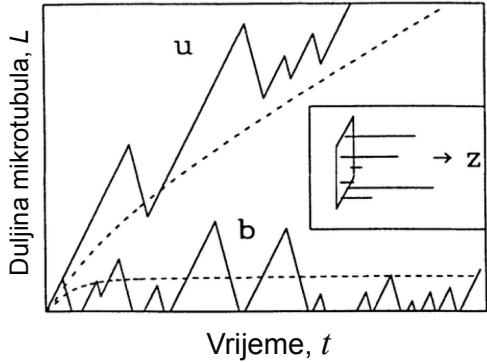
Za opis mikrotubula u stanicama važno je razumjeti njihovu mehaničku krutost. U termalnim sustavima, duljina ustrajnosti (l_p) opisuje duljinu filimenta nakon koje toplinsko savijanje postaje značajno, te smjerovi tangencijalnih vektora koji opisuju krajeve filimenta postaju nekorelirani. Za filament u tri dimenzije, može se pokazati da vremenski prosjek kosinusa $\theta(s) - \theta(0)$ opada eksponencijalno kako se duljina luka, s , povećava (Za dokaz za filamente u dvije dimenzije vidjeti Dodatak 6.3 u Ref. [67]):

$$\langle \cos(\theta(s) - \theta(0)) \rangle = e^{-s/l_p}, \quad (1.1)$$

Duljina ustrajnosti je povezana s modulom savijanja (κ) i termalnom energijom ($k_B T$):

$$l_p = \frac{\kappa}{k_B T}. \quad (1.2)$$

Za mikrotubule, duljina ustrajnosti iznosi oko 6 mm [68], što ih čini neosjetljivim na termalne fluktuacije unutar diobenog vretena, čija veličina i u najvećim ljudskim stanicama (*ovum*) ne nadilazi 0.2 mm [69]. Zbog toga se mikrotubuli unutar stanice ponašaju kao krute štapićaste strukture.



Slika 1.5: Rezultati teorijskih opisa mikrotubula od Dogterom et al. [71]. Tipičan vremenski slijed za mikrotubul koji prolazi kroz dinamičku nestabilnost: (u) neograničeni rast, (b) ograničeni rast. Prosjek preko mnogih mikrotubula s istim dinamičkim parametrima prikazan je točkastim linijama. Umetak: Shematski prikaz "polu-beskonačne" geometrije odabrane u ovom radu. Slika prilagođena iz [71].

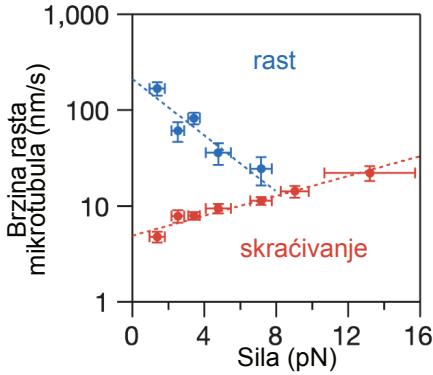
Jednodimenzionalni opis raspodjele mikrotubula

Mikrotubuli u ljudskim diobenim vretenima su pretežno međusobno poravnati, kao što se vidi u slici 1.4(b) i (c), te u Ref. [24]. Zbog toga je za opis mikrotubula unutar vretena prikladno koristiti pristup u kojem se razmatraju distribucije mikrotubula s obzirom na liniju paralelnu s mikrotubulima. Slijedeći pristupe iz prethodnih studija [70–72], gustoće mikrotubula su u ovom radu računate iz njihovih dinamičkih svojstava pomoću transportnih jednadžbi. Na primjer, tako su u Dogterom et al. [71], za konačni broj mikrotubula, gustoće rastućih (p_+) i skraćujućih mikrotubula (p_-) računate kao:

$$\frac{\partial p_+}{\partial t} = -f_{+-}p_+ + f_{-+}p_- - v_+ \frac{\partial p_+}{\partial z}, \quad (1.3)$$

$$\frac{\partial p_-}{\partial t} = f_{+-}p_+ - f_{-+}p_- + v_- \frac{\partial p_-}{\partial z}. \quad (1.4)$$

Ovdje f_{+-} predstavlja stopu katastrofe mikrotubula, a f_{-+} stopu spašavanja mikrotubula. Brzina rasta je označena s v_+ , a s v_- brzina skraćivanja mikrotubula. Parametar z označava duljinu mikrotubula, a t je vrijeme. Rezultati njihovih Monte-Carlo simulacija i pristupa srednjeg polja prikazani su na slici 1.5, a u umetku na istoj slici je shema opisanog sustava. U ovisnosti o izboru parametara mikrotubuli se mogu naći u stanjima ograničenog i neograničenog rasta, koji su u slici označeni slovima u i b . Usporedbom sa slikom 1.3, vidi se da eksperimentalni podatci koji odgovaraju toj slici su u režimu ograničenog rasta.



Slika 1.6: Izmjerene stope rasta (plavo) i skraćivanja (crveno) mikrotubula s eksponentijalnim fitom kao funkcija sile na njihovim plus krajevima u suprotnu stranu. Slika prilagođena iz Ref. [47].

Utjecaj sile na rast mikrotubula

Nakon vezanja mikrotubula na kinetohore dolazi do promjene njihove dinamike rasta, a pokazano je da tenzija na plus kraju izravno doprinosi njihovoj stabilizaciji. [47]. U rezultatima tog ekperimenta (slika 1.6) vidi se da je veza između brzine rasta i skraćivanja eksponencijalno povezana sa silom na vrh mikrotubula.

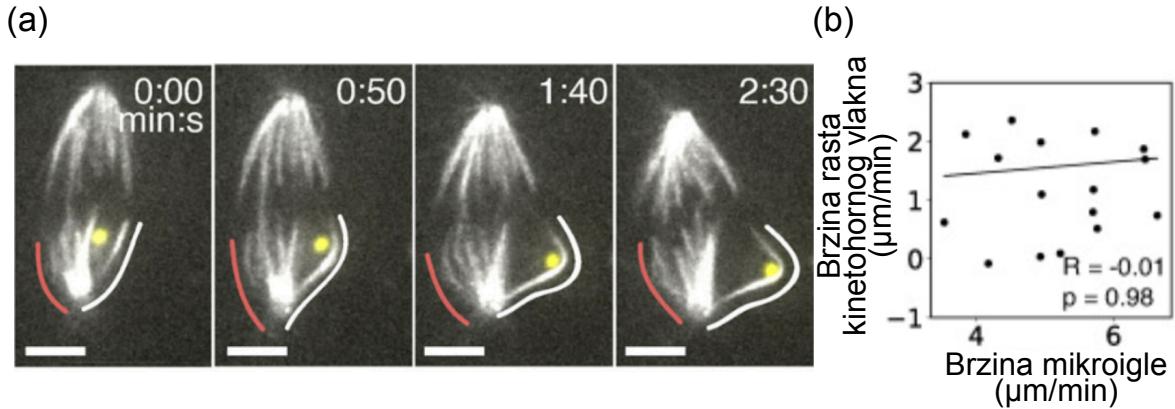
Za kinetohorna vlakna, koja predstavljaju svežanj mikrotubula povezanih s kinetohorom, pokusi s mikroiglom pokazali su da izlaganje vlakna sili razvlačenja rezultira smanjenjem stope depolimerizacije, čime se omogućuje njegovo prodljenje. [73]. U tom pokusu je procijenjeno da je brzina prodljenja kinetohornog vlakna linearno proporcionalna sili povlačenja mikroiglom (slika 1.7). Ova linearna relacija može se izraziti kao:

$$v_{gk} = \frac{1}{\xi_{gk}} F_{kMT} \quad (1.5)$$

gdje je v_{gk} brzina prodljenja kinetohornog vlakna, F_{kMT} sila na vlakno, a ξ_{gk} koeficijent proporcionalnosti koji opisuje otpornost vlakna na silu. Ova relacija će također biti korištena u ovom radu.

1.2.2 Fizikalna svojstva motornih proteina

Motorni proteini tipa kinezin-5 povezuju antiparalelne mikrotubule te stvaraju silu koračajući sa svoje dvije dimerne motorne domene prema plus kraju mikrotubula na koji su prikvačeni [74]. Struktura kinezina-5 je prikazana u slici 1.8(a).



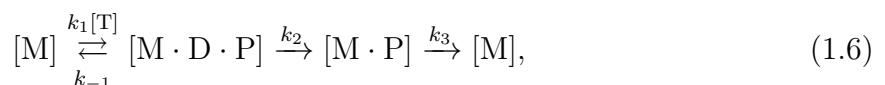
Slika 1.7: Utjecaj sile na brzinu rasta kinetohornog vlakna. (a) Vremenske snimke kretanja i preoblikovanja diobenog vretena i kinetohornog vlakna (bijelo) kao odgovor na kontinuiranu silu mikroigle (žuto). Cijelo diobeno vreteno rotira se i translatira dok se kinetohorno vlakno najbliže mikroigli (bijela linija) savija i produljuje u usporedbi s kontrolnim kinetohornim vlaknom (crvena linija). Mjerna skala, 4 μm . (b) Brzina rasta kinetohornog vlakna kao funkcija brzine mikroigle. Slike su prilagođene iz Ref. [73].

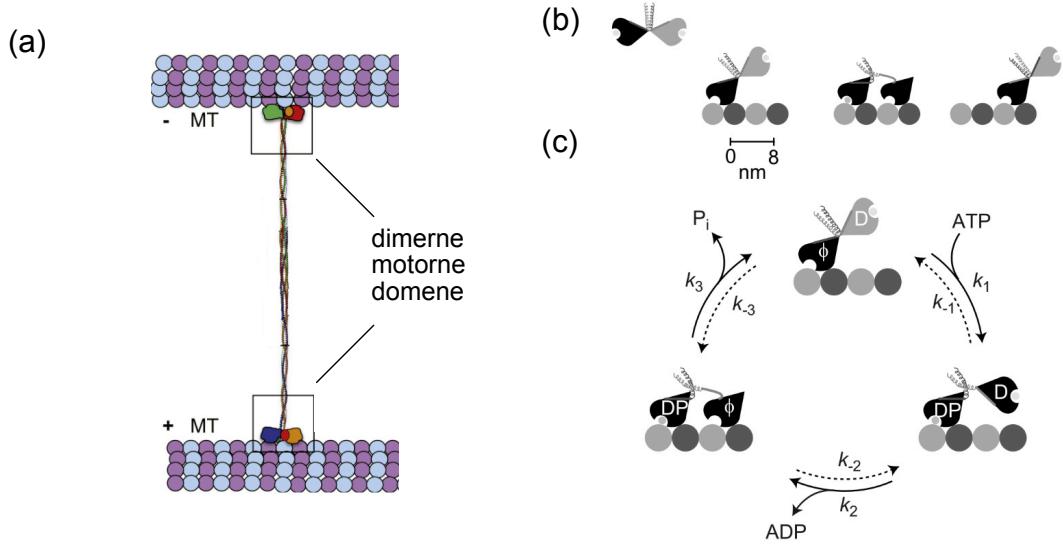
Brzina koračanja motornih proteina

Fiziku koračanja motornih proteina tipa kinezin izvodi se koristeći model procesije prikazan u slici 1.8(b) i (c) prema izvodu iz Ref. [76]. Slika 1.8(b) prikazuje kako jedna dimerna motorna domena prijeđe u jednom koraku 8 nm kolika je udaljenost između dva β -tubulina na koje se hvataju "ruke" dimerne motorne domene. Proces koračanja (Slika 1.8(c)) se odvija u nekoliko ključnih koraka:

1. U početku jedna ruka (bez nukleotida) kinezina je čvrsto vezana za mikrotubul dok je druga slobodna (s vezanim ADP)
2. Stopom k_1 se ATP veže za ruku bez nukleotida, te hidrolizom prelazi u kompleks $\text{ADP} + \text{P}_i$. Otpuštena energija uzrokuje konformacijsku promjenu koja pomiče slobodnu ruku naprijed
3. Stopom k_2 se otpušta ADP iz slobodne ruke te se ona veže za beta-tubulin
4. Stopom k_3 ruka koja je u početku bila vezana otpušta anorganski fosfat i odvaja se od beta-tubulina

Ta mehanička i kemijska reakcija može se zapisati kinetičkom jednadžbom:





Slika 1.8: Mehanizam kretanja kinezina po mikrotubulima. (a) Shematski prikaz kinezina-5 prikvačenog na antiparalelne mikrotubule (označeni su plus i minus kraj mikrotubula). Slika prilagođena iz [75]. (b-c) Model procesije kinezina. (b) Tijekom jednog koraka motor prijeđe udaljenost od 8 nm. (c) U početku jedna ruka (bez nukleotida, oznaka ϕ) kinezina je čvrsto vezana za mikrotubul dok je druga slobodna (s vezanim ADP, oznaka D). Stopom k_1 se ATP veže za ruku bez nukleotida, te hidrolizom prelazi u kompleks ADP + P_i (oznaka DP). Otpuštena energija uzrokuje konformacijsku promjenu koja pomiče slobodnu ruku naprijed. Stopom k_2 se otpušta ADP iz slobodne ruke te se ona veže za beta-tubulin. Stopom k_3 ruka koja je u početku bila vezana otpušta anorganski fosfat (oznaka P) i odvaja se od beta-tubulina. Slika preuzeta iz [76].

gdje su korištene oznake: $[M]$ je koncentracija slobodnih motora, $[M \cdot D \cdot P]$ je koncentracija kompleksa motor-ADP- P_i , $[M \cdot P]$ je koncentracija kompleksa motor- P_i , a $[T]$ je koncentracija ATP-a koju se u ovom izvodu drži konstantnom. Taj zapis je ekvivalentan zapisu pomoću niza diferencijalnih jednadžbi prvog reda:

$$\frac{d[M]}{dt} = -k_1[M][T] + k_{-1}[M \cdot D \cdot P] + k_3[M \cdot P], \quad (1.7)$$

$$\frac{d[M \cdot D \cdot P]}{dt} = k_1[M][T] - k_{-1}[M \cdot D \cdot P] - k_2[M \cdot D \cdot P], \quad (1.8)$$

$$\frac{d[M \cdot P]}{dt} = k_2[M \cdot D \cdot P] - k_3[M \cdot P]. \quad (1.9)$$

Ukupna koncentracija motora, $[M_{\text{tot}}]$, ostaje nepromijenjena i može se izraziti kao:

$$[M_{\text{tot}}] = [M] + [M \cdot D \cdot P] + [M \cdot P] \quad (1.10)$$

Cilj je izraziti brzinu hodanja pomoću koncentracije ATP-a, $[T]$, ukupne koncentracije motora, $[M_{\text{tot}}]$, i stopa reakcija, k_i , $i \in [1, 2, 3]$. Da bi se izračunala stopa u ovisnosti o koncentraciji kojom se $[M]$ vraća u početno stanje:

$$\frac{d[M]}{dt} = k_3[M \cdot P], \quad (1.11)$$

trebaju se proučiti kinetičke jednadžbe međustanja u stacionarnom limesu:

$$0 = k_1[M][T] - (k_{-1} + k_2)[M \cdot D \cdot P], \quad (1.12)$$

$$0 = k_2[M \cdot D \cdot P] - k_3[M \cdot P]. \quad (1.13)$$

Iz jednadžbe (1.13) slijedi:

$$[M \cdot P] = k_2/k_3[M \cdot D \cdot P], \quad (1.14)$$

a iz jednadžbe (1.12):

$$[M \cdot D \cdot P] = [M][T]k_1/(k_{-1} + k_2). \quad (1.15)$$

Iz tih dviju jednadžbi slijedi:

$$\frac{d[M]}{dt} = \frac{k_1 k_2 [M][T]}{k_{-1} + k_2}. \quad (1.16)$$

Sada je moguće izraziti brzinu motora kao umnožak duljine koraka δ i stope kojom se motor vraća u prvobitno stanje:

$$v_m = \delta[M][T] \frac{k_1 k_2}{(k_{-1} + k_2)}. \quad (1.17)$$

Nakon uvrštavanja (1.14) i (1.15) u (1.10) i nakon preuređivanja slijedi:

$$[M_{\text{tot}}] = [M] \frac{k_1(k_2 + k_3)}{k_3(k_{-1} + k_2)} \left(\frac{k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_3)} + [T] \right), \quad (1.18)$$

tj. ako se $[M]$ izrazi preko $[M_{\text{tot}}]$:

$$[M] = M_{\text{tot}} \frac{k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_3)} \frac{1}{\frac{k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_3)} + [T]}. \quad (1.19)$$

Kad se taj izraz uvrsti u jednadžbu (1.17) dobiva se:

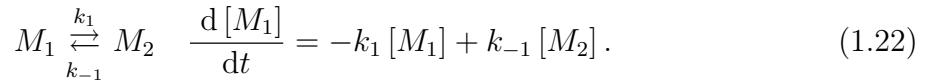
$$v_m = \delta \frac{k_2 k_3}{(k_2 + k_3)} \frac{[M_{\text{tot}}][T]}{\left(\frac{k_3(k_{-1}+k_2)}{k_1(k_2+k_3)} + [T]\right)}. \quad (1.20)$$

Ako se stavi $[M_{\text{tot}}] = 1$ slijedi brzina koračanja jednog motora u ovisnosti o koncentraciji ATP-a:

$$v_m = \delta \frac{k_2 k_3}{(k_2 + k_3)} \frac{[T]}{\left(\frac{k_3(k_{-1}+k_2)}{k_1(k_2+k_3)} + [T]\right)}. \quad (1.21)$$

Ovisnost stopa prelaska kemijske reakcije s dva stanja o sili

Kako bi se bolje razumio utjecaj sile na stope prelaska u jednadžbi (1.21) korisno je pogledati jednostavniji slučaj neke kemijske reakcije s dva stanja M_1 i M_2 :



U ravnotežnom stanju vrijedi:

$$\frac{[M_2]}{[M_1]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \exp\left(-\frac{\Delta G}{kT}\right), \quad (1.23)$$

gdje je $\Delta G = G_2 - G_1$ razlika slobodnih Gibbsovih energija krajnjeg i početnog stanja, a posljednja jednakost slijedi proizlazi iz Boltzmannove raspodjele energije. Uobičajeno prijelaz između dva stanja u kemijskim procesima sadrži i visoko-energetsko međustanje. Tada stopa prijelaza iz jedno u drugo stanje ovisi o razlici energija $\Delta G_{a1} = G_a - G_1$ i $\Delta G_{a2} = G_a - G_2$:

$$k_1 = A \exp\left(-\frac{\Delta G_{a1}}{kT}\right), \quad (1.24)$$

$$k_{-1} = A \exp\left(-\frac{\Delta G_{a2}}{kT}\right), \quad (1.25)$$

gdje A je konstanta.

Neka prijelaz $M_1 \rightarrow M_2$ uključuje i pomak $\delta = x_2 - x_1$, gdje su x_1 i x_2 položaji stanja M_1 i M_2 . Neka je položaj visokoenergetskog međustanja x_a između x_1 i x_2 , te neka je udaljenosti $\delta_a = f\delta$, gdje je $f = \frac{x_a - x_1}{x_2 - x_1}$. Sada, pod utjecajem stalne sile F obrnuto od

smjera kretanja molekule razlika energija stanja je

$$\Delta G_{a1} = G_a + f\delta F - G_1 \quad (1.26)$$

$$\Delta G_{a2} = G_a + f\delta F - (G_2 + \delta F) = G_a + (f - 1)\delta F - G_2 \quad (1.27)$$

te su nove stope prijelaza:

$$k_1 = k_1^0 \exp\left(-\frac{f\delta F}{kT}\right), \quad (1.28)$$

$$k_{-1} = k_{-1}^0 \exp\left(-\frac{(f - 1)\delta F}{kT}\right), \quad (1.29)$$

gdje su k_1^0 i k_{-1}^0 konstante brzine reakcije bez prisustva vanjske sile, a njihov omjer u ravnotežnom stanju i dalje zadovoljava Boltzmannovu raspodjelu s novim energijama:

$$\frac{[M_2]}{[M_1]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \exp\left(-\frac{\Delta G + \delta F}{kT}\right), \quad (1.30)$$

Ovisnost brzine motora o sili

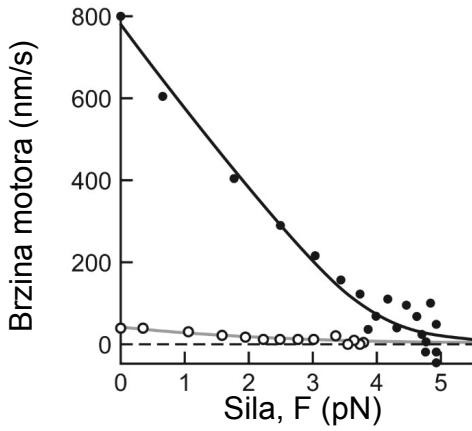
Kada motori prenose neki teret ili primjenjuju silu između dva mikrotubula, stope prelaza između stanja postaju funkcija sile. Svaki prijelaz između stanja je povezan sa strukturnim promjenama i prijeđeni put δ_i , tako da vrijedi $\delta_1 + \delta_2 + \delta_3 = 8$ nm. Ako na motor djeluje stalna sila F u smjeru suprotnom od δ_i , energetska razlika između stanja se mijenja slično kao u jednadžbama (1.26) i (1.27). U odjeljku 1.2.2 je prikazan općeniti slučaj kako se stopa prijelaza između dva stanja neke molekule, koje uključuje pomak duljine δ i visokoenergetsko međustanje u položaju koji je udaljen za $f\delta$, $f \in [0, 1]$ od početnog stanja, mijenja pod utjecajem vanjske sile. U modelu koračanja motornih proteina za relativnu udaljenost položaja visokoenergetskog međustanja se radi jednostavnosti može staviti da vrijedi $f_i = 1$, $i \in [1, 2, 3]$ kod sve tri stope prijelaza u ciklusu koračanja (k_i , $i \in [1, 2, 3]$). U tom slučaju se ovisnost stopa prelaska o sili računa kao:

$$k_i = k_i^0 \exp\left(-\frac{F\delta_i}{kT}\right), \quad (1.31)$$

$$k_{-i} = k_{-i}^0, \quad (1.32)$$

gdje su k_i^0 i k_{-i}^0 konstante brzine reakcije bez prisustva vanjske sile.

Eksperimentalni podatci za kinezin-1 preuzeti su iz Ref. [77], dok je fit modela nači-



Slika 1.9: Brzina motornog proteina kinezin-1 kao funkcija sile pri visokoj (ispunjeni kružići) i niskoj (neispunjeni kružići) koncentraciji ATP-a. Točke odgovaraju podatcima iz Ref. [77], a krivulje odgovaraju modelu u tekstu. Slika prilagođena iz Ref. [67].

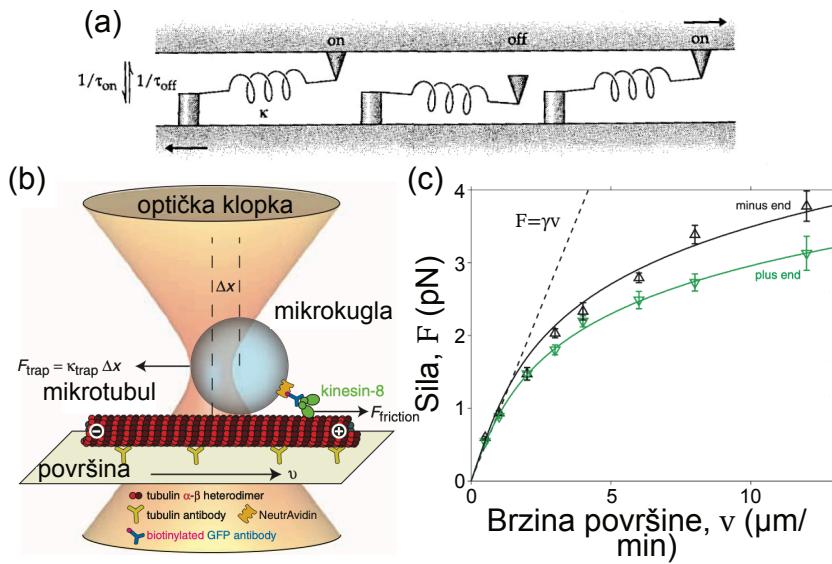
njen u Ref. [67] (slika 1.9). Ovo su dobiveni parametri: $\delta_1 = 1 \text{ nm}$, $\delta_2 = 1 \text{ nm}$, $\delta_3 = 6 \text{ nm}$, $k_1^0 = 100 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-1}^0 = 3000 \text{ s}^{-1}$, $k_2^0 = 105 \text{ s}^{-1}$ i $k_3^0 = 5000 \text{ s}^{-1}$. Na slici 1.9 vidljivo je da brzina motora opada s porastom sile F koja djeluje u suprotnom smjeru od kretanja motora. U modelu kongresije, koji će biti predstavljen u ovom radu, ta je ovisnost pojednostavljena kao:

$$v_m = v_0 \left(1 - \frac{f_m}{f_0} \right), \quad (1.33)$$

gdje je f_m sila kojom motor djeluje na objekt po kojem korača, f_0 je sila zastoja motora, a v_0 je brzina motornog proteina bez opterećenja.

1.2.3 Sila pasivnih povezujućih proteina

Dva mikrotubula koji su povezani proteinima osjećaju trenje kod međusobnog klizanja. Najjednostavniji izvod iznosa tog trenja proizlazi iz razmatranja ponašanja pojedinačnih povezujućih proteina koji se nasumično prikvačuju i otkvačuju između dva mikrotubula, te pri produljenju djeluju kao elastične opruge, kako je prikazano u slici 1.10(a). U ovom radu se slijedi izvod iz 3. poglavљa iz Ref. [67]. Neka je relativna brzina između dva susjedna mikrotubula, v , dovoljno mala tako da je tijekom vremena τ_{on} , koje predstavlja prosječno vrijeme tijekom kojeg je pasivni povezujući protein spojen između dva mikrotubula, pomak između mikrotubula, $\tau_{on}v$, znatno manji od maksimalne duljine istegnuća pasivnog povezujućeg proteina. Tada se sila istegnuća pasivnog povezujućeg proteina može opisati kao ponašanje elastične opruga s konstantom elastičnosti κ , te je prosječna sila koja se suprotstavlja smicanju $-\kappa p \tau_{on} v$, gdje je s faktorom p uzeto u obzir da tije-



Slika 1.10: Trenje pasivnih povezujućih proteina i motornih proteina. (a) Shematski prikaz modela pasivnih povezujućih proteina koji djeluju kao elastične opruge između dva mikrotubula. Slika prilagođena iz Ref. [67] (b) Shema eksperimenta s optičkom pincetom koji mjeri trenje između Kip3p/kinezin-8 proteina i mikrotubula. (c) Graf odnosa sile trenja i brzine klizanja mikrotubula, gdje je linearni režim prikazan za male brzine, dok pri većim brzinama dolazi do odstupanja od linearnosti. Slike (b) i (c) su prilagođene iz Ref. [78]

kom smicanja u prosjeku je svaki pasivni povezujući protein povezan s oba mikrotubula dio vremena τ_{on} . Budući da je ova sila proporcionalna brzini, možemo je smatrati silom otpora, te je povezani koeficijent:

$$\xi_c = \kappa p \tau_{\text{on}} \quad (1.34)$$

Ovaj koeficijent otpora, ξ_c , ne ovisi o brzini pod uvjetom da je $p\tau_{\text{on}}$ neovisan o brzini, što se događa ako su i brzina vezivanja i brzina odvajanja neovisne o brzini.

Nadalje, koristeći optičku pincetu (engl. optical tweezers) Bormuth et al. [78] su pokazali kakva se sila trenja javlja kada se motorni protein Kip3p/kinesin-8 bez prisustva ATP-a povlači duž mikrotubula (slika 1.10(b) i (c)). Bez prisustva ATP-a taj motorni protein ne korača te se time ponaša slično pasivnim povezujućim proteinima iz modela u ovom radu. Na slici 1.10(c), za brzine podloge manje od $2 \mu\text{m}/\text{min}$ odnos brzine i prouzrokovane sile je linearan, dok se pri višim brzinama gubi linearnost. Dodatno, otkrili su da postoji razlika u silama kad se protein povlači prema plus ili minus kraju mikrotubula.

U ovom doktorskom radu, budući da su brzine klizanja mikrotubula u ljudskim stanicama do oko $2 \mu\text{m}/\text{min}$ [65], prihvatljivo je koristiti aproksimaciju linearne veze između brzine i sile pasivnih povezujućih proteina. Također, budući da pasivni蛋白在 ovom radu povezuju paralelne mikrotubule, razlika koja bi nastajala pri kretanju u različitim smjerovima ne igra ulogu jer bi uvijek jedan mikrotubul išao u jednu stranu, a drugi u drugu.

1.3 Mehanika diobenog vretena i relevantni modeli

Teorijski modeli koji opisuju mehaniku diobenog vretena pružaju kvantitativne uvide u ključne procese mitoze. Obuhvatnija rasprava o važnosti teorijskih uvida u razumijevanju mitotičkog vretena može se naći npr. u Ref. [23]. Općenito teorijski radovi o diobenom vretenu se mogu podijeliti na radeve koji istražuju formiranje vretena i one koji istražuju mehanizme pozicioniranja kromosoma tijekom mitoze.

1.3.1 Modeli formiranja diobenog vretena

Jedan od ključnih procesa za pravilno odvijanje mitoze jest formiranje i održavanje stabilnosti antiparalelnih snopova mikrotubula, što je istraženo za parove antiparalelnih mikrotubula [79, 80], kao i za mikrotubule koji rastu s polova ili duž postojećih mikrotubula [81, 82].

Modeli formiranja diobenog vretena također se oslanjaju na preorijentaciju mikrotu-

bula koja vodi do njihovog poravnjanja, a pokreću je motorni proteini i pasivni povezujući proteini [83, 84]. U nekoliko teorijskih modela istraženo je kako mikrotubuli i kinetohore pretražuju prostor kako bi se približili jedni drugima i potom formirali vezu, uključujući proces biorijentacije [85–91].

1.3.2 Modeli pozicioniranja kromosoma tijekom mitoze

Mnogi su teorijski radovi istraživali što utječe na pozicioniranje kromosoma duž vretena, za pregled se može pogledati Ref. [23, 42, 92] Kvašćeve stanice su posebno pogodne za modeliranje, budući da je samo jedan mikrotubul pričvršćen za kinetohore. Za njih je pokazano da se poravnanje kromosoma može modelirati stabilnim prostornim gradijentom katastrofe i spašavanja kinetohorskih mikrotubula [93], a još bolja podudarnost između teorije i eksperimenta postiže se ako spašavanje kinetohorskih mikrotubula ovisi o napetosti, a katastrofa kinetohorskih mikrotubula ovisi o položaju kinetohora [94]. Druge teorijske studije modelirale su sile centriranja kao sile koje dolaze od skraćivanja mikrotubula, gdje vjerojatnost ulaska u katastrofu ovisi o duljini mikrotubula [95–97]. U višim eukariotima, u članku Joglekara i Hunta pokazano je kako ravnoteža sila polarnog izbacivanja, koju su modelirali kao silu koju opada s kvadratom udaljenosti od polova, može uzrokovati centriranje kromosoma, dok kinetohorni mikrotubuli silom povlačenja zbog depolimerizacije i stohastičkim odkvačivanjem prouzrokuju oscilacije u kretanju [98]. Osim sila polarnog izbacivanja i depolimerizacije mikrotubula, neki teoretski modeli također uključuju sile koje generiraju motorni proteini vezani za kinetohore, kao što je prikazano u člancima Civelekoglu-Scholey i suradnika [99, 100].

Armond i suradnici [101] su modelirali oscilacije kinetohora koristeći stohastički model koji uključuje sile polarnog izbacivanja, opružne sile centromera i sile polimerizacije i depolimerizacije kinetohornih vlakana. Također su razvili algoritam za procjenu parametara iz trajektorija sestrinskih kinetohora, koji je pokazao da dominantna sila koja pokreće kinetohore dolazi od kinetornih vlakana. Trodimenzionalni računalni model Kliuchnikov et al. [102] daje uvide kako veličina, broj, lokacija i orijentacija kromosoma i polarne izbacujuće sile utječu na točnost pozicioniranja kromosoma. U tom modelu su glavni izvor sila povlačenje od kinetohonih mikrotubula i sile polarnog izbacivanja.

Nedavna istraživanja pokazala su da polarni tok mikrotubula ovisan o duljini preklopa premosnih vlakana generira centrirajuće sile na kinetohorama tijekom metafaze [65]. Ovo otkriće upućuje na mogućnost da sličan mehanizam može igrati ulogu u kongresiji kromosoma. Međutim, dosadašnje studije nisu se sustavno bavile mehanizmima kongresije kromosoma koji uključuju sile generirane motornim proteinima koji se nakupljaju duž

antiparalelnih preklopa mikrotubula, posebno u kontekstu njihove ovisnosti o raspodjeli mikrotubula i dinamičkim promjenama broja mikrotubula na kinetohorama, te interakciji ovog mehanizma s motornim proteinima na kinetohorama.

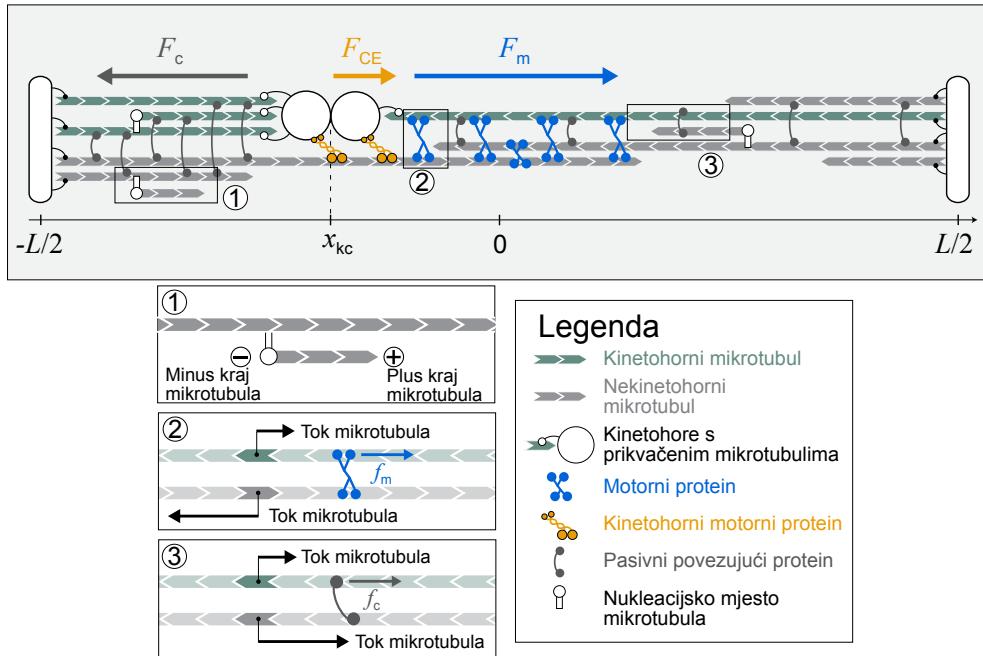
U ovom radu je predstavljen model koji opisuje sile koje pokreću kongresiju kromosoma u ljudskim diobenim vretenima. Te sile generiraju motorni proteini i pasivni povezujući proteini koji su vezani za kinetohorne mikrotubule i pokreću polarni tok tih mikrotubula. Za određivanje broja motornih proteina i povezujućih proteina, izračunate su distribucije mikrotubula na temelju njihovih dinamičkih svojstava u jednodimenzionalnom pristupu. U ovom modelu ključni proces je natjecanje između sila povlačenja ovisnih o duljini preklopa mikrotubula i broja mikrotubula koji se vežu za kinetohore. Korištenjem parametara relevantnih za ljudske stanice, utvrđeno je da motorni proteini dovode do vremena kongresije usporedivih s eksperimentalno izmjerenim vrijednostima. S druge strane, pasivni povezujući proteini mogu generirati sile koje narušavaju centriranje i ometaju kongresiju kromosoma, ali u usporedbi s motornim silama su slabiji i ne utječu na centriranje. Motorni proteini povezani s kinetohorama generiraju silu centriranja koja povećava učinkovitost kongresije. Ovdje predstavljena teorija pruža metodički okvir za razumijevanje interakcija među različitim komponentama diobenog vretena i sila koje one generiraju za transport kromosoma tijekom formiranja diobenog vretena.

2. Modeliranje sila odgovornih za kretanje kromosoma

Za analizu kongresije kromosoma, koristi se model koji opisuje raspodjelu mikrotubula duž osi paralelne s mikrotubulima i sile interakcije mikrotubula s kinetohorama. Ove sile proizlaze iz toka mikrotubula, koji ovisi o duljinama preklopa mikrotubula, a posljedica je nakupljanja motornih proteina, poput Eg5/kinezin-5 [103–105], i povezujućih proteina, poput NuMA [106], duž mikrotubula. Model također uključuje sile koje generiraju kinetohorni motorni proteini orijentirani prema plus kraju, kao što je CENP-E.

Ključni dio modela je sila koja ovisi o duljini preklopa mikrotubula, pri čemu duži preklopi antiparalelnih mikrotubula akumuliraju veći broj motornih proteina. Tako, budući da mikrotubuli vezani za kinetohoru sa strane udaljenijeg pola imaju veći antiparalelni preklop, generiraju veću силу od kinetohornih mikrotubula sa strane bližeg pola, te se na taj način kromosom centririra.

Za procjenu ove sile potrebno je izračunati distribucije mikrotubula. Odvojeno se razmatraju mikrotubuli koji su vezani za kinetohore i oni koji nisu, pri čemu se svaki od njih proteže od pola ili sa nukleacijskih mesta duž postojećih mikrotubula. Osim toga, mikrotubuli koji nisu vezani za kinetohore rastu ili su u stanju pauze. Budući da se distribucije mikrotubula dinamički generiraju, računaju se uzimajući u obzir poznata svojstva mikrotubula, uključujući nukleaciju, rast, pauzu i katastrofu. Ovaj model je originalno predstavljen u radu Ref. [107].



Slika 2.1: Shema jednodimenzionalnog modela kongresije kromosoma. Geometrija jednodimenzionalnog modela sa središtem diobenog vretena na položaju $x = 0$, dva pola na položajima $-L/2$ i $L/2$, te kinetohorama na x_{kc} . Mikrotubuli mogu biti pričvršćeni za kinetohore (kinetohorni mikrotubule) ili ostati nepovezani (nekinetohorni mikrotubuli). Protežu se od polova diobenog vretena ili mjesta nukleacije na postojećim mikrotubulima. Motorni proteini povezuju antiparalelne mikrotubule te proizvode silu F_m , dok pasivni povezujući proteini povezuju paralelne mikrotubule i proizvode silu F_c na kinetohorama. Kinetohorni motorni proteini povezuju kinetohore s mikrotubulima, proizvodeći silu F_{CE} . Pojedinačni dijelovi sheme objašnjeni su u legendi s donje desne strane. (umetak 1) Uvećani segment koji prikazuje mikrotubul nukleiran duž postojećeg mikrotubula. Dinamičniji plus kraj označen je znakom plus, a manje dinamični minus kraj označen je znakom minus. (umetak 2) Motorni protein povezuje kinetohorni mikrotubul s njegovim antiparalelnim susjedom i proizvodi silu f_m na kinetohornom mikrotubulu. Strelice označavaju smjer toka prema polu odgovarajućih mikrotubula. (umetak 3) Pasivni povezujući protein povezuje kinetohorni mikrotubul s njegovim paralelnim susjedom i proizvodi silu f_c na kinetohornom mikrotubulu. Strelice označavaju smjer toka prema polu odgovarajućih mikrotubula.

2.1 Sile motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina

2.1.1 Jednadžbe gibanja kromosoma

U ovom jednodimenzionalnom pristupu, položaj duž vretena označen je x i može poprimiti vrijednosti između $-L/2$ i $L/2$, koje predstavljaju lijevi i desni pol (Slika 2.1). Nadalje, $x = 0$ označava položaj središta vretena. Jednadžbe kretanja lijeve i desne kinetohore se računaju kao:

$$\frac{\eta}{2}v_{\text{kcl}} = F_\ell + F_{\text{KI}}, \quad (2.1)$$

$$\frac{\eta}{2}v_{\text{kcr}} = F_r - F_{\text{KI}}. \quad (2.2)$$

Ovdje, η označava citoplazmatski koeficijent trenja kromosoma, $F_{\ell,r}$ označava sile na kinetohoru, te $v_{\text{kcl},r} \equiv \frac{dx_{\text{kcl},r}}{dt}$ označava brzine kinetohora. Indeksi ℓ i r označavaju lijevu i desnu kinetohoru. Sila interakcije između dvije kinetohore dana je kao $F_{\text{KI}} = -k(\Delta x_0 - (x_{\text{kcr}} - x_{\text{kcl}}))$, s konstantom opruge k , te udaljenosti između kinetohora kada na njih ne djeluju sile Δx_0 . Inercijalni članovi su zanemareni u skladu s razmatranjem u Dodatku A.

Uvrštavanjem jednadžbi (2.1) i (2.2) u definiciju položaja središta mase sestrinskih kinetohora $x_{\text{kc}} = \frac{x_{\text{kcl}} + x_{\text{kcr}}}{2}$, dobivamo:

$$\eta v_{\text{kc}} = F_r + F_\ell, \quad (2.3)$$

gdje je brzina centra mase sestrinskih kinetohora označena s $v_{\text{kc}} \equiv dx_{\text{kc}}/dt$. Dok je jednadžba koja daje udaljenost među kinetohorama, $\Delta x = x_{\text{kcr}} - x_{\text{kcl}}$, dana kao:

$$\frac{\eta}{2} \frac{d\Delta x}{dt} + k(\Delta x - \Delta x_0) = \frac{1}{2}(F_r - F_\ell). \quad (2.4)$$

2.1.2 Sile na desnoj kinetohori

Sile na kinetohorama proizlaze iz interakcije kinetohora s plus krajevima mikrotubula ili s kinetohornim motornim proteinima koji povezuju kinetohore s mikrotubulima,

$$F_r = F_{\text{kMTr}} + F_{\text{CEr}}. \quad (2.5)$$

Ovdje se interakcija između desne kinetohore i N_{kr} mikrotubula povezanih s njom računa kao

$$F_{\text{kMTr}} = \sum_{i=1}^{N_{\text{kr}}} (F_{\text{mr}}^i + F_{\text{cr}}^i). \quad (2.6)$$

Sile koje vrše motorni proteini i pasivni povezujući proteini na i -ti mikrotubul kinetohore označene su s F_{mr}^i i F_{cr}^i . Sila koju stvaraju kinetohorni motorni proteini označena je s F_{CEr} . Ovdje i u ostaku ovog poglavlja radi jasnoće razmatramo samo sile koje djeluju samo na desnu kinetohoru, dok je raspis modela za obje strane naveden u dodatku B.

Sile kojom djeluju motorni proteini i pasivni povezujući proteini na i -ti mikrotubul na desnoj kinetohori računaju se kao:

$$F_{\text{mr}}^i = m_{\text{mr}}^i f_{\text{mr}}^i \quad (2.7)$$

$$F_{\text{cr}}^i = m_{\text{cr}}^i f_{\text{cr}}^i \quad (2.8)$$

Ovdje je broj motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina na i -tom mikrotubulu označen kao m_{mr}^i , odnosno m_{cr}^i . Prosječne sile ovih motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina označene su f_{mr}^i odnosno f_{cr}^i . Broj motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina pričvršćenih na i -tom mikrotubulu duljine l^i na desnoj kinetohori računamo kao

$$m_{\text{mr}}^i = \int_{x_{\text{kc}}}^{x_{\text{kc}}+l^i} dx c_{\text{m}} P_{\ell}(x), \quad (2.9)$$

$$m_{\text{cr}}^i = \int_{x_{\text{kc}}}^{x_{\text{kc}}+l^i} dx c_{\text{c}} P_{\text{r}}(x), \quad (2.10)$$

gdje granice integracije, a time i broj motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina, ovise o položaju kinetohora. Udio motornih proteina koji se vežu na mikrotubul desne kinetohore i susjedni antiparalelni mikrotubul, onaj koji se proteže s lijeve strane, proporcionalan je vjerojatnosti pronalaska antiparalelnog susjeda na određenoj poziciji,

$$P_{\ell}(x) = \frac{N_{\ell}(x)}{N_{\ell}(x) + N_{\text{r}}(x)}. \quad (2.11)$$

Slično tome, udio pasivnih povezujućih proteina koji se vežu na mikrotubul desne kinetohore i susjedni paralelni mikrotubul, onaj koji se proteže s desne strane, proporcionalan je vjerojatnosti pronalaska paralelnog susjeda na toj poziciji,

$$P_{\text{r}}(x) = \frac{N_{\text{r}}(x)}{N_{\ell}(x) + N_{\text{r}}(x)}. \quad (2.12)$$

N_ℓ i N_r označavaju broj nekinetohornih mikrotubula koji se protežu s lijevog i desnog pola. Ova ovisnost proizlazi iz činjenice da se motorni proteini vežu na antiparalelne mikrotubule, dok se pasivni povezujući proteini vežu na paralelne mikrotubule. Linearne gustoće motornih proteina i povezujućih proteina označene su s c_m i c_c . Također, potrebno je definirati duljine paralelnih i antiparalelnih preklopa s mikrotubulom duljine l^i . Za desnu kinetohoru dane su kao

$$l_{\text{apr}}^i = \int_{x_{\text{kc}}}^{x_{\text{kc}}+l^i} dx P_\ell(x), \quad (2.13)$$

$$l_{\text{ppr}}^i = \int_{x_{\text{kc}}}^{x_{\text{kc}}+l^i} dx P_r(x). \quad (2.14)$$

S obzirom na to da su linearne gustoće motornih proteina i povezujućih proteina konsstantne, jednadžbe (2.9) i (2.10) pojednostavljaju se na $m_{\text{mr},\text{cr}}^i = c_{m,c} l_{\text{apr},\text{ppr}}^i$.

Koristeći jednadžbe (2.13) i (2.14) može se izračunati prosječna duljina preklopa kinetohornog snopa mikrotubula sastavljenog od N_{kr} mikrotubula:

$$L_{\text{apr}} \equiv \frac{1}{N_{\text{kr}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{kr}}} l_{\text{apr}}^i, \quad (2.15)$$

$$L_{\text{ppr}} \equiv \frac{1}{N_{\text{kr}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{kr}}} l_{\text{ppr}}^i. \quad (2.16)$$

Brzinu motornih proteina računa se iz odnosa sile i brzine kako je već predstavljeno u poglavlju 1.2.2:

$$v_{\text{mr}} = v_0 \left(1 - \frac{f_{\text{mr}}}{f_0} \right). \quad (2.17)$$

Ovdje je f_{mr} sila kojom motor vuče desni kinetohorni mikrotubul na koji je prikvačen, f_0 je sila zastoja motora, a v_0 je brzina motornog proteina bez opterećenja. Sila jednog motornog proteina na kinetohorni mikrotubul je shematski prikazana u 2. umetku u slici 2.1. Brzina motora jednaka je relativnoj brzini klizanja antiparalelnih mikrotubula, gdje $v_{\text{mr}} = v_{\text{kfr}}^i - v_{\text{f}\ell}$ opisuje slučaj u kojem kinetohorni mikrotubul kliže prema polu brzinom v_{kfr}^i , a pridruženi nekinetohorni mikrotubul $v_{\text{f}\ell}^i$. S druge strane, pasivni povezujući proteini ne mogu generirati aktivnu силu između mikrotubula. Međutim, ako mikrotubuli klize jedan u odnosu na drugi, pasivni povezujući proteini svojim stohastičkim spajanjem i odspajanjem stvaraju efektivnu силу prigušenja koja se opira relativnom gibanju mikrotubula, kao što je predstavljeno u poglavlju 1.2.3. U ovom modelu, sila prigušenja pasivnih

povezujućih proteina koji povezuju paralelne mikrotubule dana je kao

$$f_{\text{cr}} = -\xi_c v_{\text{cr}}, \quad (2.18)$$

gdje ξ_c označava efektivni koeficijent trenja. Ta sila je shematski prikazana u 3. umetku u slici 2.1. Relativna brzina klizanja i -tog kinetohornog mikrotubula i pridruženog nekinetohornog paralelnog mikrotubula dana je kao $v_{\text{cr}} = v_{\text{kfr}}^i - v_{\text{fr}}$.

2.1.3 Uskladeno gibanje mikrotubula smanjuje broj varijabli u modeliranju sila na kinetohore

Kako bi bilo moguće izračunati sile na kinetohore koje dolaze od prikvačenih mikrotubula, potrebno je pretpostaviti da svi kinetohorni mikrotubuli iz istog snopa klize istom brzinom, $v_{\text{kfr}}^i = v_{\text{kfr}}$, a time i sve sile u istom snopu imaju istu vrijednost, $f_{\text{mr},\text{cr}}^i = f_{\text{mr},\text{cr}}$. Ova aproksimacija, koja znatno smanjuje broj varijabli u problemu, nalazi opravdanje u činjenici da su mikrotubuli unutar snopa međusobno povezani pasivnim vezujućim proteinima, osiguravajući njihovo uskladeno gibanje i prijenos sila [106]. U tom ograničenju, izraz za silu između mikrotubula i kinetohora pojednostavljuje se na:

$$F_{\text{kMTr}} = M_{\text{mr}} f_{\text{mr}} + M_{\text{cr}} f_{\text{cr}}. \quad (2.19)$$

Broj motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina na snopu kinetohornih mikrotubula dan je kao $M_{\text{mr},\text{cr}} = \sum_{i=1}^{N_{\text{kr}}} m_{\text{mr},\text{cr}}^i$, a u kombinaciji s jednadžbama (2.9) - (2.16) dobiva se

$$M_{\text{mr},\text{cr}} = c_{\text{m,c}} N_{\text{kr}} L_{\text{apr,ppr}}. \quad (2.20)$$

Također, na temelju rezultata iz [65], pretpostavlja se da je brzina toka nekinetohornih mikrotubula konstantna, $v_{\text{f},\text{fr}} = \mp v_0/2$.

Rast i skraćivanje mikrotubula povezanih s kinetohorama ovisi o sili kojom djeluju nekinetohore [47, 73]. U ovom modelu je ta brzina rasta kinetohornih mikrotubula aproksimirana linearnim izrazom $v_{\text{gkr}} = \frac{1}{\xi_{\text{gk}}} F_{\text{kMTr}}$, kako je objašnjeno u poglavljju 1.2.1. Ovdje se brzina rasta kinetohornih mikrotubula, v_{gkr} , računa iz relativnog kretanja kinetohore mikrotubula, koji se gibaju prema polu brzinom v_{kfr} u odnosu na kinetohoru, koja se kreće brzinom v_{kc} , što rezultira s $v_{\text{gkr}} = v_{\text{kfr}} - v_{\text{kc}}$. Efektivni koeficijent trenja označen je ξ_{gk} .

Model također uključuje kinetohorne motorne proteine koji generiraju sile na kinetohoru koračajući duž nekinetohornih mikrotubula u smjeru plus kraja mikrotubula (usp.

poglavlje 1.2.2). Sila N_{CE} kinetohornih motornih proteina računa se kao

$$F_{CEr} = N_{CE}[f_{CEr}P_r(x_{kc}) + f_{CE\ell}P_\ell(x_{kc})], \quad (2.21)$$

gdje smjer i iznos sile pojedinog kinetohornog motornog proteina ovisi o orijentaciji mikrotubula na koju se kinetohorni motor spaja. Za desnu sestrinsku kinetohoru, sile kinetohornih motornih proteina označene su s $f_{CE\ell}$ i f_{CEr} , gdje indeksi r i ℓ označavaju je li se motor prikvačio na desni ili lijevi mikrotubul. Te se sile računaju iz odnosa brzine i sile $v_{CE\ell} = v_{CE0}(-1 - \frac{f_{CE\ell}}{f_{CE0}})$ i $v_{CEr} = v_{CE0}(1 - \frac{f_{CEr}}{f_{CE0}})$, gdje su $f_{CE\ell}$ i f_{CEr} sile kinetohornih motornih proteina na kinetohore. Brzina kinetohornih motornih proteina računa se kao relativna brzina kinetohora u odnosu na pridružene nekinetohorne mikrotubule, $v_{CE\ell} = (v_{kc} - v_{fr})$ i $v_{CEr} = (v_{kc} - v_{fr})$. Pritom f_{CE0} označava silu zastoja kinetohornih motornih proteina, a v_{CE0} brzinu bez opterećenja.

2.2 Veza raspodjele mikrotubula i pridruženih proteina

Kako bi se izračunao broj mikrotubula, duljine preklopa, kao i vjerojatnosti $P_{r,\ell}$ koji se koriste u jednadžbama (2.9) - (2.21), potrebno je odrediti distribucije mikrotubula, koje će biti izračunate u aproksimaciji srednjeg polja. Prijelaz s opisa diskretne distribucije mikrotubula na pristup temeljen na aproksimaciji srednjeg polja detaljno je objašnjen u Dodatku C. Ovaj pristup zanemaruje fluktuacije te je stoga prikladan za sustave s velikim brojem mikrotubula. Na primjer, adekvatan je za opis nekinetohornih mikrotubula, čiji je broj u metafazi oko 5000. Ovaj pristup također može dati procjenu za kinetohorne mikrotubule, čiji je broj oko 10, kako je izmjereno u Ref. [24]. Iz tih razloga, pristup srednjeg polja relevantan je za opisivanje tipičnog kretanja kinetohora, dok su stohastičke simulacije prikladne za proučavanje varijabilnosti u kretanju pojedinačnih kinetohora, kao u Ref. [90, 91, 102]. U poglavlju 5 su glavni rezultati modela uspoređeni s prilagođenim modelom koji koristi stohastičke simulacije za računanje broja kinetohornih mikrotubula, dok je broj nekinetohornih određen vrijednostima iz teorije srednjeg polja.

2.2.1 Raspodjele nekinetohornih mikrotubula

U ovom modelu se distribucije mikrotubula opisuju u jednoj dimenziji, kao što je uvedeno u poglavlju 1.2.1. Ovaj model opisuje rast i pauziranje mikrotubula, nukleiranih ili na polovima ili duž već postojećih mikrotubula. Gustoće ovih četiriju distribucija označene su $n_p(l)$, $\tilde{n}_p(l)$, $\rho_n(l, x)$, odnosno $\tilde{\rho}_n(l, x)$. Te gustoće određuju broj mikrotubula duljine

l koji se protežu s pola, $dN_p = (n_p + \tilde{n}_p)dl$, te broj mikrotubula duljine l koji se protežu od mesta nukleacije na položaju x , $dN_n = (\rho_n + \tilde{\rho}_n)dldx$. Za mikrotubule koji se protežu s pola, jednadžbe su:

$$\frac{\partial n_{\text{pr}}}{\partial t} = k_p \delta(l) - k_{\text{ps}} n_{\text{pr}} - v_g \frac{\partial n_{\text{pr}}}{\partial l}, \quad (2.22)$$

$$\frac{\partial \tilde{n}_{\text{pr}}}{\partial t} = k_{\text{ps}} n_{\text{pr}} - k_{\text{cat}} \tilde{n}_{\text{pr}}. \quad (2.23)$$

Raspodjela mikrotubula koji su nukleirani na postojećim mikrotubulima dana je jednadžbama:

$$\frac{\partial \rho_{\text{nr}}}{\partial t} = k_n c \delta(l) N_{\text{pr}}(x) - k_{\text{ps}} \rho_{\text{nr}} - v_g \frac{\partial \rho_{\text{nr}}}{\partial l}, \quad (2.24)$$

$$\frac{\partial \tilde{\rho}_{\text{nr}}}{\partial t} = k_{\text{ps}} \rho_{\text{nr}} - k_{\text{cat}} \tilde{\rho}_{\text{nr}}. \quad (2.25)$$

U jednadžbi (2.22) prvi izraz na desnoj strani opisuje nukleaciju mikrotubula na polu sa stopom nukleacije k_p . Mikrotubuli u trenutku nukleacije imaju duljinu jednaku nuli, te se to vidi u članu s diracovom delta funkcijom, $\delta(l)$. Drugi član opisuje prijelaz mikrotubula s rasta na stanje pauze, što se događa sa stopom k_{ps} . Posljednji član opisuje rast mikrotubula, s efektivnom brzinom rasta v_g . Pauzirajući mikrotubuli koji se protežu od pola opisani su jednadžbom (2.23). U toj jednadžbi, k_{cat} predstavlja stopu kojom pauzirajući mikrotubuli ulaze u stanje katastrofe. Jednom kad uđu u katastrofu, mikrotubuli nestaju iz populacija.

U jednadžbi (2.24) prvi član opisuje nukleaciju mikrotubula duž već postojećih mikrotubula koji se protežu od pola sa stopom nukleacije pomnoženom s gustoćom nukleacijskih mesta duž jednog mikrotubula, $k_n c$. Pauziranje mikrotubula nukleiranih duž već postojećih mikrotubula opisuje jednadžba (2.25). Broj mikrotubula koji se protežu od pola do točke x računa se kao

$$N_{\text{pr}}(x) = \int_{L/2-x}^{\infty} dl n_{\text{pr}}(l) + \tilde{n}_{\text{pr}}(l). \quad (2.26)$$

2.2.2 Raspodjele kinetohornih mikrotubula

Rastući mikrotubuli mogu se vezati na kinetohore kada je njihov plus kraj u blizini kinetohora. Broj kinetohornih mikrotubula koji se protežu od pola računa se kao:

$$\frac{dN_{\text{kpr}}}{dt} = (v_{\text{kc}} + v_g) n_{\text{pr}} \Big|_{l=L/2-x_{\text{kc}}} p_{\text{att}} \left(1 - \frac{N_{\text{kr}}}{N_0} \right) - k_{\text{off}} N_{\text{kpr}}, \quad (2.27)$$

a gustoća kinetohornih mikrotubula nukleiranih duž već postojećih mikrotubula računa se kao:

$$\frac{\partial n_{\text{knr}}}{\partial t} = (v_{\text{kc}} + v_g) \rho_{\text{nr}}|_{x=l+x_{\text{kc}}} p_{\text{att}} \left(1 - \frac{N_{\text{kr}}}{N_0} \right) - k_{\text{off}} n_{\text{knr}}. \quad (2.28)$$

U ove dvije jednadžbe, prvi član s desne strane predstavlja brzinu vezivanja mikrotubula na kinetohore, koja je proporcionalna toku plus krajeva mikrotubula na položaju kinetohora. Tok se izračunava kao umnožak brzine plus krajeva mikrotubula u odnosu na kinetohoru i gustoće plus krajeva nekinetohornih mikrotubula. Vjerojatnost vezanja na slobodno vezno mjesto na kinetohori označena je s p_{att} . Udio slobodnih veznih mjesta računa se kao broj slobodnih veznih mjesta, $N_0 - N_{\text{kr}}$, podijeljen s ukupnim brojem veznih mjesta, N_0 . Mikrotubuli se odvajaju od kinetohora stopom k_{off} . Ukupan broj kinetohornih mikrotubula dan je kao:

$$N_{\text{kr}} = N_{\text{kpr}} + N_{\text{knr}}(x_{\text{kc}}), \quad (2.29)$$

gdje se broj kinetohornih mikrotubula nukleiranih duž već postojećih mikrotubula koji dosežu položaj x računa kao:

$$N_{\text{knr}}(x) = \int_{x-x_{\text{kc}}}^{L/2-x_{\text{kc}}} n_{\text{knr}} dl, \quad (2.30)$$

za x između x_{kc} i $L/2$.

Srednje duljine antiparalelnih i paralelnih preklopa kinetohornih mikrotubula, L_{ap} i L_{pp} , računaju se kao:

$$L_{\text{apr},\text{ppr}} = \frac{1}{N_{\text{kr}}} \left(N_{\text{kpr}} \int_{x_{\text{kc}}}^{L/2} dx P_{\ell,\text{r}} + \int_0^{L/2-x_{\text{kc}}} dl n_{\text{knr}} \int_{x_{\text{kc}}}^{x_{\text{kc}}+l} dx P_{\ell,\text{r}} \right). \quad (2.31)$$

U ovoj aproksimaciji srednjeg polja, suma preko pojedinačnih kinetohornih mikrotubula iz jednadžbe (2.16) zamijenjena je integralima i podijeljena je na dva dijela. Prvi dio opisuje kinetohorne mikrotubule koji se protežu od pola do kinetohora i svi imaju istu duljinu. Drugi dio opisuje kinetohorne mikrotubule nukleirane duž već postojećih mikrotubula.

2.3 Ovisnost brzine kinetohora o raspodjeli motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina

Pomicanje kromosoma uzrokovano je silama na kinetohore, kao što je izraženo u jednadžbi (2.3), a te sile dolaze od djelovanja motornih i pasivnih povezujućih proteina na kineto-

orne mikrotubule, kao i djelovanjem kinetohornih motornih proteina direktno na same kinetohore. Budući da te sile ovise o brojevima motornih proteina, pasivnih povezujućih proteina i kinetohornih motornih proteina, primjenom jednadžbi (2.19) i (2.21) brzina kinetohora može se izraziti kao funkcija tih brojeva:

$$\begin{aligned}\eta v_{kc} = & M_{mr}f_{mr} + M_{m\ell}f_{m\ell} \\ & + M_{cr}f_{cr} + M_{c\ell}f_{c\ell} \\ & + 2N_{CE}[f_{CEr}P_r + f_{CE\ell}P_\ell],\end{aligned}\quad (2.32)$$

gdje je korištena aproksimacija da brojevi motornih proteina i pasivnih vezivnih proteina ne ovise o položajima zasebnih kinetohora, nego samo o položaju centra mase x_{kc} . Međutim i same sile $f_{mr,\ell}$, $f_{cr,\ell}$, $f_{CEr,\ell}$ ovise o brzinama kinetohora, te se korištenjem jednadžbi (B.3) - (B.5) dobiva:

$$\begin{aligned}2N_{CE}[f_{CEr}P_r + f_{CE\ell}P_\ell] = & 2N_{CE}f_{CE0}\frac{v_{CE0}-v_0/2}{v_{CE0}}(P_\ell - P_r) \\ & - 2N_{CE}\frac{f_{CE0}}{v_{CE0}}v_{kc},\end{aligned}\quad (2.33)$$

gdje je korišteno $v_{fr,\ell} = \pm v_0/2$ i $P_\ell + P_r = 1$. Zbroj sila motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina na kinetohornim mikrotubulima slijedi kao:

$$\begin{aligned}M_{mr}f_{mr} + M_{m\ell}f_{m\ell} + M_{cr}f_{cr} + M_{c\ell}f_{c\ell} = & \\ \beta_r(\frac{v_0}{2} - v_{kfr}) + \beta_\ell(-\frac{v_0}{2} - v_{kfl}).\end{aligned}\quad (2.34)$$

U toj jednadžbi je korištena skraćena notacija $\beta_{r,\ell} = M_{mr,\ell}\frac{f_0}{v_0} + M_{cr,\ell}\xi_c$.

Da bi se pronašle brzine toka kinetohornih mikrotubula, $v_{kfr,\ell}$, koriste se jednadžbe za rast kinetohornih mikrotubula, jed. (B.2), i uvrštavanjem izraza sila-brzina iz jed. (B.3) - (B.5) dobiva se:

$$v_{kfr} = \frac{\xi_{gk}}{\xi_{gk} + \beta_r}v_{kc} + \frac{\beta_r}{\xi_{gk} + \beta_r}\frac{v_0}{2}\quad (2.35)$$

$$v_{kfl} = \frac{\xi_{gk}}{\xi_{gk} + \beta_l}v_{kc} - \frac{\beta_l}{\xi_{gk} + \beta_l}\frac{v_0}{2}.\quad (2.36)$$

Uvrštavanjem ovih jednadžbi u (2.34) dobiva se jednadžba koja pokazuje brzinu kinetohora kao funkciju ukupnog broja motornih proteina, umreživača i motornih proteina

povezanih s kinetohorom:

$$\begin{aligned} v_{kc} &= \frac{v_0}{2} \frac{1}{\gamma_{MT}} \left(\frac{f_0}{v_0} (M_{mr} - M_{m\ell}) + \xi_c (M_{cr} - M_{c\ell}) \right) \\ &\quad + (v_{CE0} - \frac{v_0}{2}) \frac{1}{\gamma_{CE}} \frac{f_{CE0}}{v_{CE0}} (N_{CE} P_\ell - N_{CE} P_r), \end{aligned} \quad (2.37)$$

gdje su uvedene dodatne skraćene oznake: $\gamma_{MT} = (\eta + 2N_{CE} \frac{f_{CE0}}{v_{CE0}})(1 + \frac{\beta_r}{\xi_{gk}})(1 + \frac{\beta_\ell}{\xi_{gk}}) + 2\frac{\beta_l\beta_r}{\xi_{gk}} + \beta_r + \beta_l$ i $\gamma_{CE} = \gamma_{MT}/(1 + \frac{\beta_r}{\xi_{gk}})(1 + \frac{\beta_\ell}{\xi_{gk}})$. Smjer kretanja kinetohora u potpunosti ovisi o odnosu između broja proteina koji vuku prema desno (M_{mr} , M_{cr} i $N_{CE} P_\ell$) i broja proteina koji vuku prema lijevo ($M_{m\ell}$, $M_{c\ell}$ i $N_{CE} P_r$). Ove vrijednosti su usko povezane s raspodjelama mikrotubula te posredno i s položajem kinetohora, što je vidljivo iz definicija u jednadžbama (2.11), (2.12) i (2.20).

3. Analitička rješenja modela

U ovom modelu, kretanje kinetohora je regulirano kombinacijom sila koje stvaraju motorni proteini i pasivni umreživači na kinetohornim mikrotubulima, kao i kinetohornim motornim proteinima (vidi jednadžbu (2.37)). Osim toga, raspodjela ovih proteina ovisi o geometriji sustava, uključujući broj mikrotubula i njihovu prosječnu duljinu. Zato se proučavaju doprinosi svakog proteina zasebno, kao i njihovo zajedničko djelovanje. Na ovaj način, dobiva se sveobuhvatno razumijevanje kako oni rade zajedno kako bi osigurali pravilnu kongresiju kromosoma.

3.1 Parametri relevantni za ljudske stanice opravdavaju separaciju vremenskih skala

Jednadžbe raspodjele mikrotubula iz našeg modela mogu se riješiti egzaktno (vidi dodatke D i E), no za razumijevanje sustava dovoljna su stacionarna rješenja zbog razlike u vremenskim skalama. Za mikrotubule koji nisu prikvačeni na kinetohore vrijeme potrebno da izrastu do svoje prosječne duljine iznosi približno $l_0/v_g \approx 0.07$ min, što je zanemarivo u odnosu na vrijeme potrebno za kongresiju, obično 5–10 min [55, 113]. Za mikrotubule prikvačene na kinetohore, prosječno vrijeme relaksacije, tj. vrijeme potrebno da se njihov broj, određen dinamikom pričvršćivanja i otkvačivanja, dovede u ravnotežu, iznosi otprije 2.8 min, što je također kraće od vremena potrebnog za kongresiju. U odjeljku 5 je pokazano kako može doći do razlika u kretanju kinetohora kad se uspoređuju simulacije i rješenja koja koriste aproksimaciju srednjeg polja.

Parametri modela odabrani su na temelju nedavnih *in vitro* i *in vivo* mjerena. Tablica I prikazuje parametre mikrotubula i kinetohora, a tablica II prikazuje parametre vezane uz motorne proteine, pasivne povezujuće proteine i kinetohorne motorne proteine.

Tablica I: Parametri mikrotubula i kinetohora.

Parametar	Vrijednost	Opis
L	12 μm	Udaljenost od pola do pola [108]
l_0	2.6 μm	Duljina mikrotubula ^a
k_{ps}	11 min^{-1}	Stopa pauze mikrotubula ^b
v_g	$k_{\text{ps}}l_0 \approx 28 \mu\text{m}/\text{min}$	Brzina rasta mikrotubula
k_{cat}	0.6 min^{-1}	Stopa katastrofe mikrotubula ^c
k_p	600 min^{-1}	Nukleacija mikrotubula na polovima ^{d, e}
k_{nc}	0.5 ($\mu\text{m min}$) $^{-1}$	Nukleacija mikrotubula duž mikrotubula ^f
N_0	15	Maks. broj kinetohornih mikrotubula [109]
p_{att}	0.02	Vjerojatnost vezanja kinetohornih mikrotubula ^{g, e}
k_{off}	0.35 min^{-1}	Stopa odvajanja kinetohornih mikrotubula [110]
ξ_{gk}	300 pN min / μm	Efektivni koeficijent trenja ^h
η	0.08 pN min / μm	Citoplazmatsko trenje [111]

^a Procijenjeno korištenjem podataka elektronske mikroskopije [24] koja je izmjerila duljinu diobenog vretena od 9.48 μm i prosječnu duljinu mikrotubula koji nisu kinetohorni od 2.07 μm . Skaliranjem na duljinu diobenog vretena od 12 μm , izračunata je prosječna duljina mikrotubula od $2.6 \mu\text{m} \approx 2.07 \mu\text{m} \times \frac{12 \mu\text{m}}{9.48 \mu\text{m}}$.

^b Izračunato dijeljenjem brzine rasta mikrotubula iz Ref. [112] s prosječnom duljinom mikrotubula, $k_{\text{ps}} \approx \frac{28 \mu\text{m}/\text{min}}{2.6 \mu\text{m}}$.

^c Temeljeno na podacima elektronske mikroskopije [24] koja je izbrojala oko 5400 mikrotubula koji nisu kinetohorni u stanici, i EB1 mjerjenjima [112] koja su izbrojala 62869 točaka u 75 okvira za mikrotubule u 3 stanice, dajući procjenu od 280 rastućih mikrotubula. Sada, koristeći odnos ravnoteže između rastućih i pauzirajućih mikrotubula iz jedn. (3.8) i (3.9) izračunato je $k_{\text{cat}} = k_{\text{ps}} \frac{280}{5400 - 280}$.

^d Izračunato korištenjem eksperimentalnih podataka iz [112]. Od 280 rastućih mikrotubula, 65% mikrotubulnih tragova u prometafazi je usmjereni prema suprotnom polu, a 30% tragova mikrotubula potječe iz zona do 1.5 μm udaljenih od polova koji se mogu pripisati mikrotubulima nukleiranim na polu. Posljedično, stopa nukleacije na polu može se izračunati iz procjene broja rastućih mikrotubula nukleiranih na polu kao $\frac{k_p}{k_{\text{ps}}} = 280 \times 0.65 \times 0.30 = 54.6$, iz čega je izračunato k_p .

^e Napomena: parametri k_p i p_{att} relevantni su za jednodimenzionalni model, ali trebaju se prilagoditi za složenije geometrije.

^f Izračunato korištenjem eksperimentalnih podataka iz [112] gdje je broj mikrotubula nukleiran duž postojećih mikrotubula koji rastu prema suprotnom polu $280 \times 0.65 \times 0.7 = 127.4$. Korištenjem parametara našeg modela možemo procijeniti broj rastućih mikrotubula nukleiranih duž jednog mikrotubula kao $\frac{l_0}{k_{\text{ps}}} k_{\text{nc}}$ i pomnožen brojem mikrotubula na polovima daje $N_p \frac{l_0}{k_{\text{ps}}} k_{\text{nc}} = 127.4$, gdje je $N_p = (\frac{k_p}{k_{\text{cat}}} + \frac{k_p}{k_{\text{ps}}})$.

^g Procijenjeno kao omjer površine kinetohore [91] i površine poprečnog presjeka diobenog vretena [108].

^h Procijenjeno kao sila na kinetohorama, 300 pN [34], podijeljena brzinom rasta kinetohornih mikrotubula, 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ [65].

Tablica II: Parametri motornih i pasivnih povezujućih proteina.

Parametar	Vrijednost	Opis
c_m	$10 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$	Koncentracija motornih proteina ^a
f_0	5 pN	Sila zastoja mot. proteina [114]
v_0	$4 \text{ } \mu\text{m}/\text{min}$	Brzina motornih proteina [65]
c_c	$20 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$	Koncentracija pasivnih veznih proteina ^a
ξ_c	$0.05 \text{ pN min}/\mu\text{m}$	Efektivno trenje pasivnih veznih proteina ^a
N_{CE}	20	Broj kinetohornih motornih proteina [115]
f_{CEO}	6 pN	Sila zastoja kinetohornih motornih proteina [116]
v_{CEO}	$2.4 \text{ } \mu\text{m}/\text{min}$	Brzina kinetohornih motornih proteina ^a

^a Procijenjeno.

3.1.1 Raspodjela nekinetohornih mikrotubula

U dodatku D pokazano je da distribucija mikrotubula dolazi u ravnotežno stanje nakon otprilike $l_0/v_g = 0.07 \text{ min}$ što je zanemarivo u odnosu na vrijeme potrebno za kongresiju, te je opravdano računati raspodjele nekinetohornih mikrotubula u granici stacionarnog stanja. Stacionarne jednadžbe za raspodjele nekinetohornih mikrotubula koji su orijentirani s lijeva na desno, izračunate iz jed. (2.22) - jed.(2.25), dane su kao:

$$0 = k_p \delta(l) - k_{ps} n_{p\ell} - \frac{\partial v_g n_{p\ell}}{\partial l}, \quad (3.1)$$

$$0 = k_{ps} n_{p\ell} - k_{cat} \tilde{n}_{p\ell}, \quad (3.2)$$

$$0 = k_n c \delta(l) N_p(x) - k_{ps} \rho_{n\ell} - \frac{\partial v_g \rho_{n\ell}}{\partial l}, \quad (3.3)$$

$$0 = k_{ps} \rho_{n\ell} - k_{cat} \tilde{\rho}_{n\ell}, \quad (3.4)$$

gdje je $N_p(x)$ dan u jednadžbi (2.26). Jednadžbe (3.1) i (3.3) rješavaju se u dva koraka. Prvo, pronalaze se rješenja homogenog dijela koja za ove dvije jednadžbe imaju isti oblik s različitim integracijskim konstantama, $A_{n,\rho} \exp\left(-\frac{l}{l_0}\right)$, gdje je

$$l_0 \equiv \frac{v_g}{k_{ps}}. \quad (3.5)$$

Uzimajući u obzir nehomogene članove, izračunavaju se integracijske konstante koje daju stacionarne raspodjele nekinetohornih mikrotubula koji se protežu od pola i onih koji

nastaju uz već postojeće mikrotubule:

$$n_{p\ell} = \frac{k_p}{v_g} \exp\left(-\frac{1}{l_0}l\right), \quad (3.6)$$

$$\begin{aligned} \rho_{n\ell} &= \frac{k_n c}{v_g} \exp\left(-\frac{1}{l_0}(L/2)\right) \left(\frac{k_p}{k_{ps}} + \frac{k_p}{k_{cat}}\right) \\ &\quad \times \exp\left(-\frac{1}{l_0}(l+x)\right). \end{aligned} \quad (3.7)$$

Rješenja jed. (3.2) i jed. (3.4) pružaju jednostavan odnos između broja rastućih i pauzirajućih mikrotubula:

$$\tilde{n}_{p\ell} = \frac{k_{ps}}{k_{cat}} n_{p\ell}, \quad (3.8)$$

$$\tilde{\rho}_{n\ell} = \frac{k_{ps}}{k_{cat}} \rho_{n\ell}. \quad (3.9)$$

Na temelju izračunatih analitičkih izraza za raspodjele mikrotubula, može se dobiti broj mikrotubula na bilo kojem položaju duž osi vretena. Mikrotubuli koje prelaze položaj x su oni s minus-krajem i plus-krajem na suprotnim stranama tog položaja. Stoga se izračun za broj mikrotubula koji pokazuju prema desno daje kao:

$$\begin{aligned} N_\ell(x) &= \int_{L/2+x}^{\infty} dl(n_{p\ell} + \tilde{n}_{p\ell}) + \\ &\quad \int_{-L/2}^x dx' \int_x^{\infty} dx'' [\rho_{n\ell}(x', x'' - x') + \tilde{\rho}_{n\ell}(x', x'' - x')] \\ &= \left(\frac{k_p}{k_{ps}} + \frac{k_p}{k_{cat}}\right) \exp\left(-\frac{L}{2l_0}\right) \exp\left(-\frac{x}{l_0}\right) \\ &\quad \times \left[1 + \left(\frac{k_n c}{k_{ps}} + \frac{k_n c}{k_{cat}}\right) (L/2 + x)\right]. \end{aligned} \quad (3.10)$$

Raspodjele za mikrotubule koji pokazuju uljevo dobivaju se supstitucijom $x \rightarrow -x$ u jednadžbama (3.7), j(3.9) i (3.10), dok jednadžbe (3.6) i (3.8) ovise samo o duljini mikrotubula, pa su identične za oba smjera.

3.1.2 Raspodjela kinetohornih mikrotubula

U ovom poglavljiju računaju se raspodjele kinetohornih mikrotubula u granici stacionarnog stanja, dok je proučavanje vremenske promjene broja kinetohornih mikrotubula dano u dodatku E. U izračunima će brzina kinetohore, v_{kc} , biti zanemarena budući da je puno

manja od brzine rasta mikrotubula v_g . S tim aproksimacijama, jed. (2.27) i (2.28) pojednostavljaju se u:

$$0 = v_g p_{\text{att}} \left(1 - \frac{N_{k\ell}}{N_0}\right) n_{p\ell} \Big|_{l=L/2+x_{\text{kc}}} - k_{\text{off}} N_{kp\ell} \quad (3.11)$$

$$0 = v_g p_{\text{att}} \left(1 - \frac{N_{k\ell}}{N_0}\right) \rho_{n\ell} \Big|_{x=x_{\text{kc}}-l} - k_{\text{off}} n_{kn\ell}. \quad (3.12)$$

Ove jednadžbe opisuju mikrotubule pričvršćene na lijevu kinetohoru. One povezuju raspodjelu kinetohornih mikrotubula koji se protežu od pola s raspodjelom mikrotubula koji se protežu sa već postojećih mikrotubula, dajući linearnu vezu s koeficijentom koji ovisi o položaju duž vretena:

$$n_{kn\ell} = \frac{\rho_{n\ell} \Big|_{x=x_{\text{kc}}-l}}{n_{p\ell} \Big|_{l=L/2+x_{\text{kc}}}} N_{kp\ell}. \quad (3.13)$$

Uvrštavanjem ovog rezultata u jednadžbu za ukupni broj mikrotubula na lijevoj kinetohori, jed. (2.29), i koristeći činjenicu da $\rho_{n\ell} \Big|_{x=x_{\text{kc}}-l}$ ne ovisi o l , slijedi da

$$N_{k\ell} = N_{kp\ell} \left(1 + (L/2 - x_{\text{kc}}) \frac{\rho_{n\ell} \Big|_{x=x_{\text{kc}}-l}}{n_{p\ell} \Big|_{l=L/2+x_{\text{kc}}}} \right). \quad (3.14)$$

Kombiniranjem ovog rezultata s jed. (3.11) i (3.12), broj lijevih kinetohornih mikrotubula koji dosežu pol dan je kao

$$N_{kp\ell} = \frac{N_0 n_{p\ell} \Big|_{l=L/2+x_{\text{kc}}}}{\frac{N_0 k_{\text{off}}}{v_g p_{\text{att}}} + n_{p\ell} \Big|_{l=L/2+x_{\text{kc}}} + (L/2 - x_{\text{kc}}) \rho_{n\ell} \Big|_{x=x_{\text{kc}}-l}}, \quad (3.15)$$

dok je raspodjela duljina mikrotubula koji ne dosežu pol dana kao

$$n_{kn\ell} = \frac{N_0 \rho_{n\ell} \Big|_{x=x_{\text{kc}}-l}}{\frac{N_0 k_{\text{off}}}{v_g p_{\text{att}}} + n_{p\ell} \Big|_{l=L/2+x_{\text{kc}}} + (L/2 - x_{\text{kc}}) \rho_{n\ell} \Big|_{x=x_{\text{kc}}-l}}. \quad (3.16)$$

Broj kinetohornih mikrotubula nukleiranih duž postojećih mikrotubula koji dosežu položaj x računa se kao:

$$\begin{aligned} N_{kn\ell}(x) &= \int_{x_{\text{kc}}-x}^{L/2+x_{\text{kc}}} n_{kn\ell} dl \\ &= \left(\frac{L}{2} + x \right) n_{kn\ell}. \end{aligned} \quad (3.17)$$

Konkretno, ukupni broj kinetohornih mikrotubula nukleiranih duž postojećih mikrotubula dan je s $N_{\text{kn}\ell}(x_{\text{kc}})$.

Raspodjele kinetohornih mikrotubula na desnoj kinetohori dobivaju se supstitucijom $x \rightarrow -x$ i $x_{\text{kc}} \rightarrow -x_{\text{kc}}$ u jed. (3.15) - (3.17), kao i korištenjem raspodjela mikrotubula desne strane umjesto lijeve.

Ove jednadžbe pružaju potpuni opis raspodjela kinetohornih mikrotubula u stacionarnom stanju. Važno je napomenuti da ove raspodjele ovise o položaju kinetohora, x_{kc} , što znači da se raspodjele mikrotubula mijenjaju kako se kinetohore kreću tijekom procesa kongresije. Koristeći ove raspodjele, moguće je izračunati ukupni broj motornih proteina i umreživača na kinetohornim mikrotubulima, $M_{\text{mr},\ell}$ i $M_{\text{cr},\ell}$, kao i vjerojatnosti da kinetohorni motorni proteini budu povezani s lijevim ili desnim mikrotubulom, P_ℓ i P_r . Ovi parametri su ključni za određivanje brzine kinetohora prema jednadžbi (2.37).

4. Rezultati modela i usporedba s eksperimentima

Glavni cilj ovog poglavlja je prikazati rezultate modela za kretanja kromosoma i usporediti ih s eksperimentalnim podacima. Fokus će biti na fizikalnim objašnjenjima dinamike kretanja kromosoma, uključujući raspodjele mikrotubula, ulogu motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina, te kako ti faktori zajedno utječu na kongresiju kromosoma.

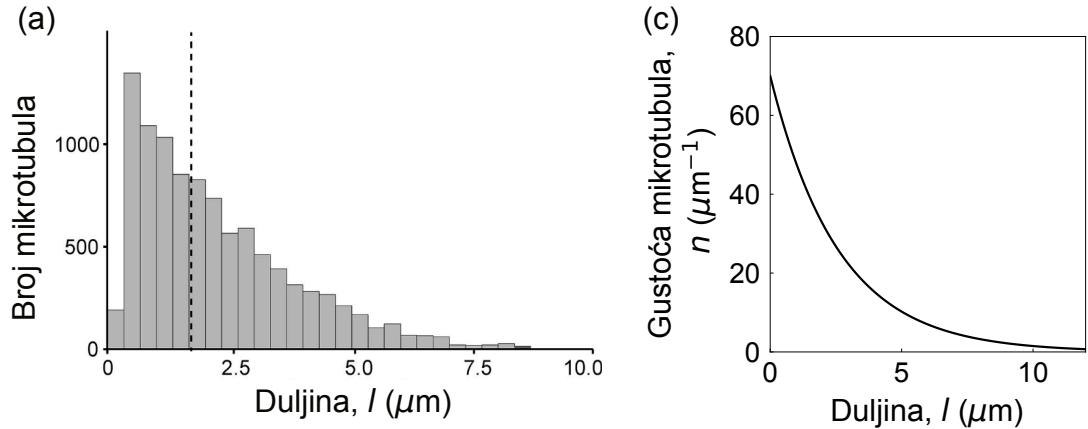
4.1 Raspodjele mikrotubula te njihovi preklopi

Jednadžba (2.37) pokazuje kako je smjer i iznos brzine kinetohora u ovom modelu određena odnosom između broja proteina koji vuku prema desno ili lijevo, a ti brojevi direktno ovise o raspodjeli mikrotubula kao što je vidljivo u jednadžbama (2.11), (2.12) i (2.20). Prvo je nužno usporediti i verificirati koliko raspodjele mikrotubula koje su dobivene iz modela odgovaraju realnim raspodjelama iz eksperimentalnih mjerena. Zatim će biti analizirane raspodjele kinetohornih mikrotubula i njihovi preklopi s nekinetohornim mikrotubulima koji su ključni za razumijevanje dinamike kretanja kinetohora. Na kraju će biti prikazano kako različiti parametri modela utječu na te raspodjele.

4.1.1 Usporedba raspodjela nekinetohornih mikrotubula s rezultatima elektronske i svjetlosne mikroskopije

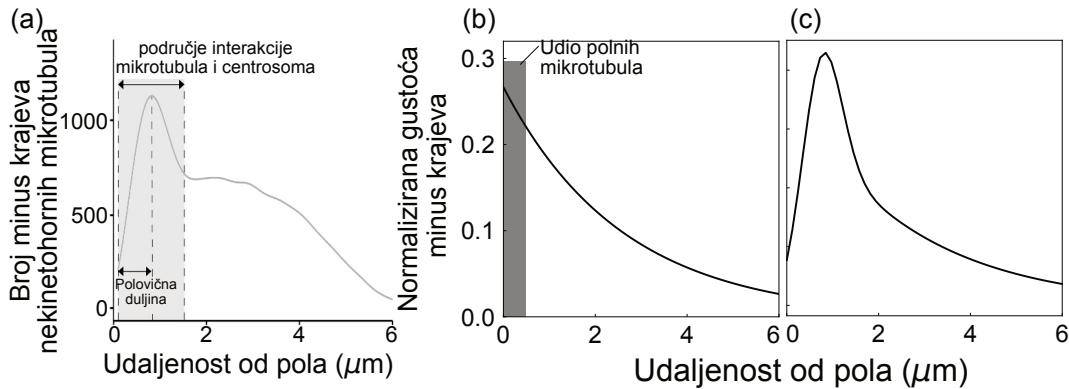
Kiewisz et al. (2022) [24] su koristili elektronsku tomografiju velikih razmjera kako bi proveli detaljne rekonstrukcije unutarnje strukture HeLa stanica. Time su omogućili analizu trodimenzionalne strukture kinetohornih vlakana i okolnih mikrotubula. Uočljivo je da raspodjela duljina mikrotubula u slici 4.1(a) slijedi otprilike eksponencijalnu raspodjelu, što se odlično slaže s modelom iz ovog rada (slika 4.1(b)). S druge strane eksperimentalno dobivena raspodjela minus krajeva kao funkcija udaljenosti od pola (slika 4.2(a))

je više kompleksna nego u ovdje predstavljenom modelu (slika 4.2(b)). Bolje slaganje bi se ostvarilo kad bi nukleacija na polovima bila proporcionalna s Gaussovom raspodjelom (slika 4.1(c)) . Takav, prošireni model je prikazan u Dodatku F.



Slika 4.1: Usporedba raspodjela duljina mikrotubula dobivenih elektronskom mikroskopijom i modelom iz ovog rada. (a)Histogram koji prikazuje distribuciju duljine nekinetohornih mikrotubula ($n=14458$). Isprekidana linija označava prosječnu duljinu nekinetohornih mikrotubula ($l = 2.0 \pm 1.7 \mu\text{m}$). Slika preuzeta iz [24]. (b) Raspodjela nekinetohornih mikrotubula kao funkcija duljina u modelu.

Yamashita et al. (2015) [112] su pak koristili tehniku mikroskopije s rešetkastim svjetlosnim listom (eng. lattice light-sheet microscopy) u kombinaciji s fluorescentno označenim EB1 proteinom koji se veže na plus krajeve mikrotubula. Ova metoda je omogućila praćenje trodimenzionalne dinamike rasta mikrotubula s visokom vremenskom (< 1 s) i prostornom rezolucijom. Razvili su i matematičke alate za analizu prostornih varijacija u dinamici rasta mikrotubula unutar diobenog vretena. Time su mogli odrediti smjer i brzinu rasta, kao i trajanje rasta pojedinačnih mikrotubula unutar trodimenzionalnog prostora stanice. Njihova mjerena pružaju komplementaran uvid u organizaciju mikrotubula diobenog vretena, s naglaskom na dinamiku plus krajeva, za razliku od statičke slike dobivene elektronskom tomografijom u [24]. Iz njihovih je mjerena moguće odrediti raspodjele plus krajeva rastućih mikrotubula, te ih usporediti s rezultatima modela iz ovog rada kao i s proširenim modelom iz Dodatka F (slika 4.3(a)). Vidljivo je da ni osnovni, ni prošireni model ne odgovaraju potpuno svojom raspodjelom obliku koji se dobiva u mjeranjima. Mijenjanjem prosječne duljine mikrotubula na $l_0 = 2 \mu\text{m}$ dobiva se donekle bolje podudaranje (slika 4.3(b)), ali se oblik raspodjele dobivene eksperimentalnim mjeranjima ne odgovara u potpunosti onima iz predstavljenih modela, te bi se u budućim razmatranjima moglo uzeti u obzir utjecaj proteina koji zaustavljaju rast duljih



Slika 4.2: Usporedba raspodjela minus krajeva mikrotubula dobivenih elektronskom mikroskopijom i modelom iz ovog rada. (a) Broj minus krajeva nekinetohornih mikrotubula kao funkcija njihove udaljenosti od pola (središta majčinske centriole). Sivo područje označava zonu interakcije nekinetohornih mikrotubula s centrosom te polovicu širine te zone. Desna isprekidana linija označava granicu područja interakcije mikrotubula i centrosoma, određenu kao dvostruku polovicu širine distribucijskog vrha udaljenosti minus krajeva. Slika preuzeta iz [24]. (b) Normirana raspodjela minus krajeva nekinetohornih mikrotubula kao funkcija udaljenosti od pola dobivena iz modela. (c) Normirana raspodjela minus krajeva nekinetohornih mikrotubula kao funkcija udaljenosti od pola dobivena iz proširenog modela iz Dodatka F.

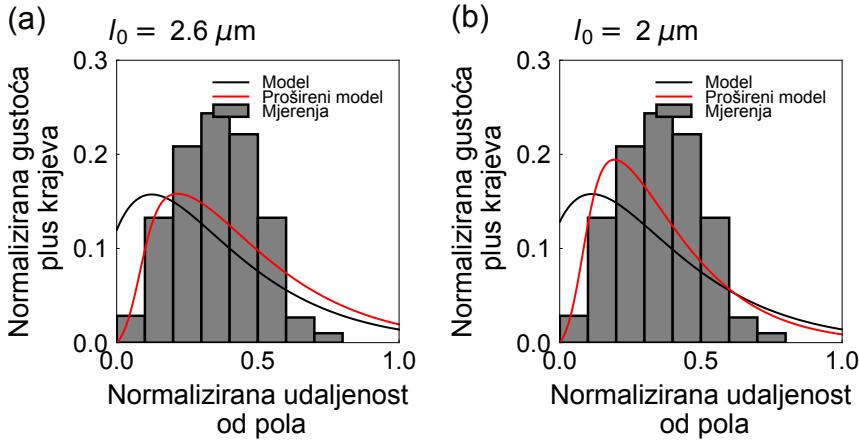
mikrotubula [63, 117, 118].

U dalnjim poglavljima koristi se osnovni model, dok se utjecaj promjene raspodjela minus krajeva na kongresiju kromosoma može naći u poglavljju 4.4.4

4.1.2 Raspodjele kinetohornih mikrotubula i pripadajući preklopi

Nakon što je pokazano kako model dobro opisuje eksperimentalno opažene raspodjele nekinetohornih mikrotubula, radi boljeg razumijevanje dinamike mehanizma kretanja kinetohora koji se temelji na silama ovisnim o duljini preklopa mikrotubula, potrebno je detaljnije analizirati raspodjele kinetohornih mikrotubula i njihove preklope.

Tipični oblici ovih raspodjela za skup parametara iz Tablice I prikazani su na Slici 4.4. Ovi grafovi ilustriraju kako se broj mikrotubula mijenja duž osi diobenog vretena, što je važno za razumijevanje sila koje djeluju na kinetohore. Izračuni pokazuju da se broj kinetohornih mikrotubula linearno povećava s blizinom kinetohore. Uspoređujući distribucije kinetohornih mikrotubula na lijevoj i desnoj strani, može se uočiti da ima skoro tri put više kinetohornih mikrotubula na strani bližeg pola nego na strani udaljenijeg

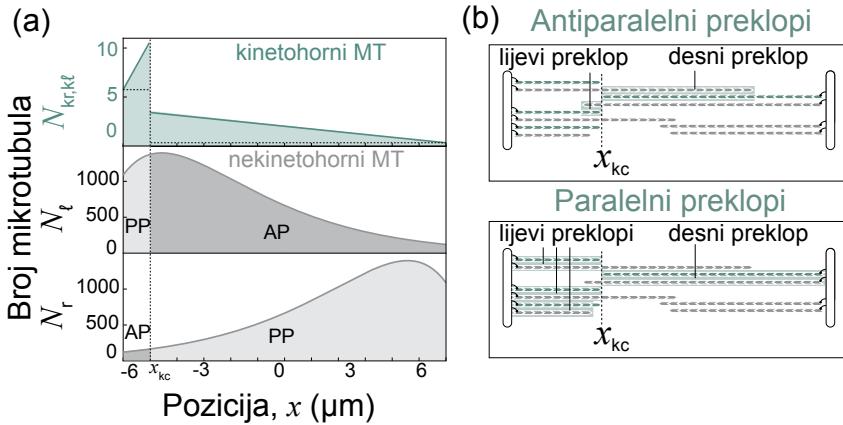


Slika 4.3: Usporedba raspodjela plus krajeva rastućih mikrotubula dobivenih svjetlosnom mikroskopijom i modelima iz ovog rada. (a) Normirane raspodjela plus krajeva nekinetohornih mikrotubula kao funkcija normirane udaljenosti od pola za $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$. (b) Normirane raspodjela plus krajeva nekinetohornih mikrotubula kao funkcija normirane udaljenosti od pola za $l_0 = 2 \mu\text{m}$. Crne linije u (a) i (b) odgovaraju osnovnom modelu, crvene linije odgovaraju proširenom modelu iz Dodatka F, dok histogrami odgovaraju mjerjenjima iz [112].

pola. Broj nekinetohornih mikrotubula ima maksimum u blizini odgovarajućeg pola i smanjuje se na udaljenijim pozicijama. Vizualizacijom udjela nekinetohornih mikrotubula koji tvore antiparalelni preklop s kinetohornim mikrotubulima, može se vidjeti da postoji znatno veće područje preklopa na strani udaljenijeg pola u usporedbi sa stranom bližeg pola (Slika 4.4(a) sredina i dno, te shematski prikazano u gornjoj shemi u slici 4.4(b)). S druge strane, za paralelne preklope nije odmah vidljivo koja strana ima veći ukupan preklop dan umnoškom broja kinetohornih mikrotubula i prosječne duljine paralelnog preklopa. Takva situacija je prikazana shematski u donjoj shemi u slici 4.4(b).

Oblik i karakteristike ovih raspodjela značajno ovise o nekoliko ključnih parametara. Jedan od najvažnijih je prosječna duljina mikrotubula (l_0). Promjene u l_0 značajno utječu na doseg raspodjela mikrotubula, što je demonstrirano u Slici 4.5. Promjene u l_0 su ovim grafovima, kao i u ostaku rada, dobivene mijenjanjem brzine rasta mikrotubula, v_g , dok je brzina pauziranja konstantna. Za kratke mikrotubule (slika 4.5(a)), vidljivo je da antiparalelni preklop ne postoji jer nema mikrotubula koji dosežu položaj kinetohore s desne strane. Paralelni preklop postoji na strani bližeg pola. Za duge mikrotubule, broj kinetohornih mikrotubula je sličan na obje kinetohore, te je jasno vidljivo da su i paralelni i antiparalelni preklopi na strani daljeg pola veći od onih na strani bližeg pola.

Osim prosječne duljine, stope nukleacije k_p i k_{nc} značajno utječu na prostornu distri-

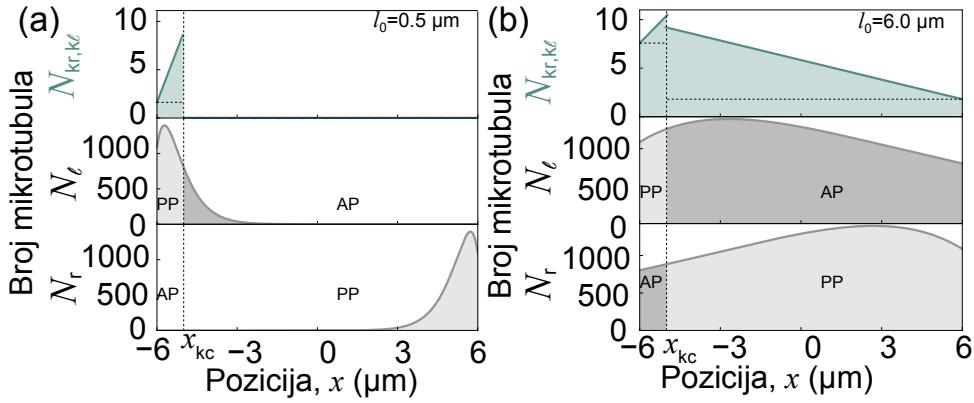


Slika 4.4: Raspodjele kinetohornih i nekinetohornih mikrotubula i pripadajući preklopi za normalne parametre. (a) Distribucije kinetohornih mikrotubula (gornji dio) i nekinetohornih mikrotubula (srednji i donji dio). Oznake AP i PP označavaju koji dio raspodjele nekinetohornih mikrotubula je u antiparalelnom odnosno paralelnom preklopu s kinetohornim mikrotubulima. Broj desnih kinetohornih mikrotubula, na položajima desno od $x_{kc} = -5 \mu\text{m}$, izračunava se kao $N_{kp} + N_{kn}(x)$, dok se broj lijevih kinetohornih mikrotubula, na položajima lijevo od x_{kc} , izračunava analogno. Iscrtkane linije u (a) gore prikazuju koliko je kinetohornih mikrotubula nukleiranih na polu, a koliko duž drugih mikrotubula. Analitički izrazi za distribucije mikrotubula na lijevoj strani $N_{kp}(x)$, $N_{kn}(x)$ i $N_\ell(x)$ su dani u jednadžbama (3.15), (3.17) i (3.10). Parametri važni za raspodjelu mikrotubula su dani u Tablici I. (b) Shematski prikaz antiparalelnih (gore) i paralelnih (dole) preklopa za kinetohore u položaju x_{kc} . Zelena boja označava mikrotubule prihvачene za kinetohore, a siva nekinetohornih mikrotubule.

buciju nekinetohornih mikrotubula. Jednadžba (3.10) pokazuje linearnu ovisnost ukupnog broja mikrotubula o stopi nukleacije na polovima, dok oblik distribucije ovisi o relativnom doprinosu članova proporcionalnim s $\exp\left(-\frac{L/2+x}{l_0}\right)$ i $(L/2+x)\exp\left(-\frac{L/2+x}{l_0}\right)$, što je određeno parametrom k_{nc} . Ova dva doprinosi imaju različite prostorne ovisnosti - prvi eksponencijalno opada s udaljenosću od pola, dok drugi prvo raste, dostiže maksimum, a zatim eksponencijalno opada. Kako bi broj mikrotubula u diobenom vretenu ostao stalан, u slici 4.6 je mijenjan omjer broja mikrotubula nukleiranih na polu u odnosu na ukupan broj mikrotubula, a taj omjer je označen s α . Po uzoru na jednadžbu iz fusnote d u tablici I ovisnost stope nukleacije na polu o α slijedi kao:

$$k_p(\alpha) = 280 \times 0.65 \times \alpha \times k_{ps}, \quad (4.1)$$

gdje je 280 broj rastućih mikrotubula, a 0.65 udio mikrotubula koji rastu prema suprotnom polu, kako je objašnjeno u spomenutoj fusnoti. Slično, uvrštavajući jednadžbu

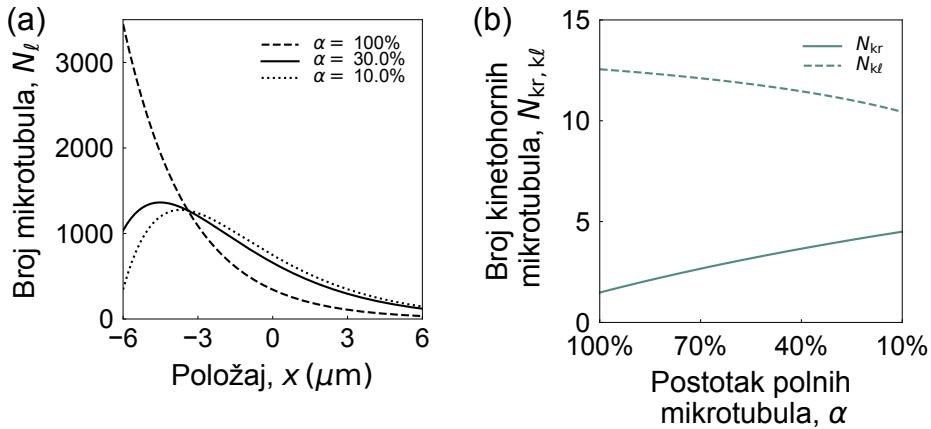


Slika 4.5: Raspodjele kinetohornih i nekinetohornih mikrotubula i pripadajući preklopi za kratke (a), $l_0 = 0.5 \mu\text{m}$, i duge mikrotubule (b), $l_0 = 6 \mu\text{m}$. (gore) Broj lijevih kinetohornih mikrotubula, na položajima lijevo od x_{kc} , i desnih kinetohornih mikrotubula, na položajima desno od x_{kc} , kao funkcija položaja x . (dole) Broj nekinetohornih mikrotubula (N_l gore i N_r dolje) kao funkcija položaja x duž diobenog vretena. Oznaće AP i PP označavaju koji dio raspodjele nekinetohornih mikrotubula je u antiparalelnom odnosno paralelnom preklopu s kinetohornim mikrotubulima. Preostali parametri su dani u Tablicama I.

(4.1) u jednadžbu iz fusnote e u tablici I slijedi izraz za stopu nukleacije duž postojećih mikrotubula:

$$k_n(\alpha)c = \frac{(1-\alpha)}{\alpha} \frac{k_{\text{cat}}k_{\text{ps}}}{l_0(k_{\text{cat}} + k_{\text{ps}})}. \quad (4.2)$$

Na slici 4.6(a) se vidi kako povećavanje udjela nukleacije duž postojećih mikrotubula raširuje raspodjelu nekinetohornih mikrotubula. To za posljedicu ima promjenu broja mikrotubula prikvačenih na kinetohore. Na slici 4.6(b), za kinetohore u $x_{\text{kc}} = -5 \mu\text{m}$ se vidi da se broj mikrotubula na kinetohori s bližeg pola smanjuje kako se smanjuje udio polnih mikrotubula, dok u isto vrijeme broj mikrotubula na kinetohori s daljeg pola povećava. U usporedbi s brojem kinetohornih mikrotubula za parametre iz tablice I, za $\alpha = 1$ broj mikrotubula na kinetohori s daljeg pola je oko 2.5 puta manji, dok je broj mikrotubula s bližeg pola veći za faktor 1.1, što može imati veliki utjecaj na centriranje kromosoma, ali o tome više u poglavljju 4.4.



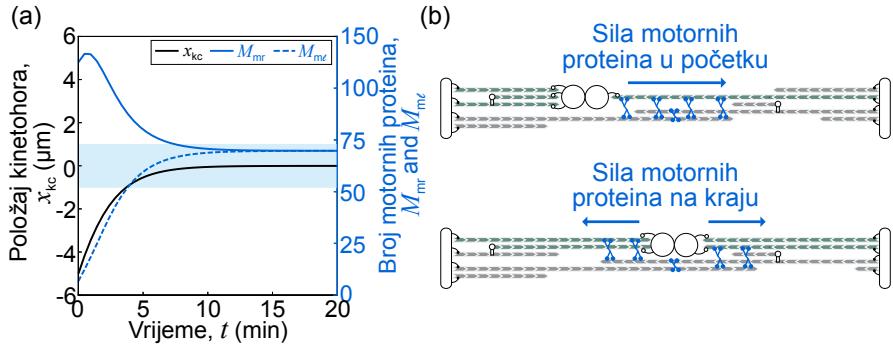
Slika 4.6: Ovisnost raspodjela mikrotubula o omjeru broja mikrotubula nukleiranih na polu u odnosu na ukupan broj mikrotubula, α . (a) Broj lijevih ne kinetohornih mikrotubula N_ℓ kao funkcija položaja za tri različita udjela polnih mikrotubula. $\alpha = 0.3$ je vrijednost iz tablice I. (b) Ovisnost broja kinetohornih mikrotubula s desne (N_{kr}) i lijeve (N_{kl}) strane o udjelu polnih mikrotubula α .

4.2 Motorni proteini koji se nakupljaju se u preklopima mikrotubula pokreću kongresiju kromosoma

Kako bi se istražila sposobnost motornih proteina da generiraju sile odgovorne za kongresiju kromosoma, isključeni su utjecaji pasivnih povezujućih proteina i kinetohornih motornih proteina postavljanjem odgovarajućih parametara na nulu. U ovom režimu može se preračunati jednadžba (2.37), koja se tada pojednostavljuje na:

$$\frac{dx_{kc}}{dt} = \frac{v_0}{2} \frac{\frac{M_{mr}}{M_{m\ell}} - 1}{\frac{M_{mr}}{M_{m\ell}} + 1} \left[1 + \frac{\eta v_0}{f_0} + \frac{\eta \xi_{gk} v_0^2}{f_0^2 (M_{mr} + M_{m\ell})} + \left(2 \frac{f_0}{v_0 \xi_{gk}} + \frac{\eta}{\xi_{gk}} \right) \frac{M_{mr} M_{m\ell}}{M_{mr} + M_{m\ell}} \right]^{-1} \quad (4.3)$$

Ovdje je očito da je najveća brzina kojom se kinetohore mogu kretati $v_0/2$ i da se kinetohora kreće prema strani s većim brojem motornih proteina. Model se rješava numeričkom integracijom jednadžbe (4.3), u kojoj se broj motornih proteina izračunava iz jednadžbi (2.20), (2.29) i (2.31).



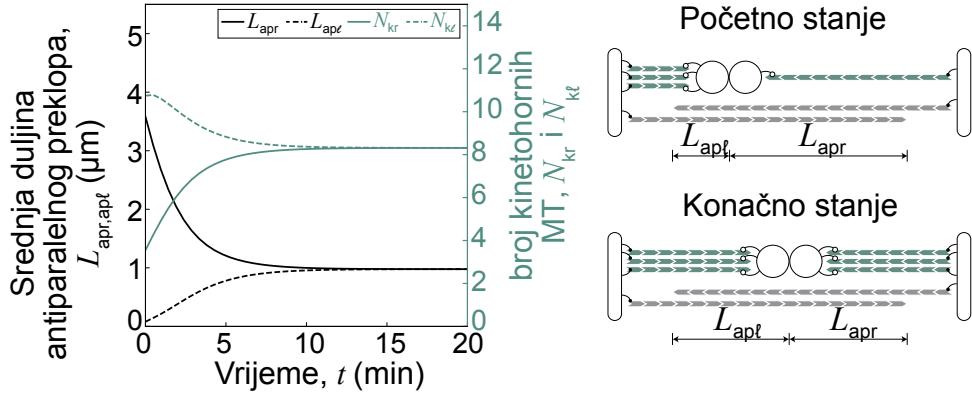
Slika 4.7: Motorni proteini pokreću kongresiju kromosoma. (a) Rješenja modela za slučaj samo s motornim proteinima, koja prikazuju vremenski tijek pozicije kinetohore (crna puna linija) i broj motornih proteina na desnoj (puna plava linija) i lijevoj (isprekidana plava linija) strani za kinetohore inicijalno na $x = -5 \mu\text{m}$. Plavo područje označava zonu ekvatorske ravnine diobenog vretena. Parametri su dani u Tablicama I i II, osim za $c_c = 0$ i $N_{CE} = 0$. Slika prilagođena iz Ref. [107]. (b) Shematski prikaz raspodjele motornih proteina i sila koje proizvode na kinetohore u početnom (gore) i konačnom (dole) stanju.

4.2.1 Motorni proteini pokreću kongresiju kromosoma

Za parametre relevantne za diobena vretena ljudskih stanica (Tablice I i II), kinetohore, koje su inicijalno bile na poziciji blizu lijevog pola, udaljavaju se od njega i približavaju se zoni ekvatora diobenog vretena u približno 4 minute (Slika 4.7(a)). Na temelju ovog grafa, također se može procjeniti prosječna brzina kinetohora od oko $1 \mu\text{m}/\text{min}$. Ova predviđanja u skladu su s eksperimentalno izmjerenim vremenima kongresije, kad se usporede s centralnim kromosomima (Slika 3f u Ref. [113]), kao i sa srednjom vrijednosti izmjerenih brzina kinetohora [55]. Kvantitativno slaganje između teorije i eksperimenata sugerira da sile ovisne o duljini preklopa mikrotubula koje generiraju motorni proteini mogu pokretati kongresiju kromosoma.

Kretanje kinetohore pokreću motorni proteini koji se akumuliraju u većem broju na strani udaljenijeg pola nego na bližoj strani (Slika 4.7, plave linije). Budući da broj motornih proteina ovisi o antiparalelnim preklopima mikrotubula, prikladno je proučiti kako izgleda distribucija kinetohornih i nekinetohornih mikrotubula za kinetohore na početnoj poziciji $x_{kc} = -5 \mu\text{m}$ (Slika 4.4(a)). Vizualizacijom udjela nekinetohornih mikrotubula koji tvore antiparalelni preklop s kinetohornim mikrotubulima, može se vidjeti da postoji znatno veće područje preklopa na strani udaljenijeg pola u usporedbi sa stranom bližeg pola (Slika 4.4(a) sredina i dno). Ova razlika je glavni razlog za veću prosječnu duljinu antiparalelnog preklopa mikrotubula i posljedično veći broj motornih proteina na strani

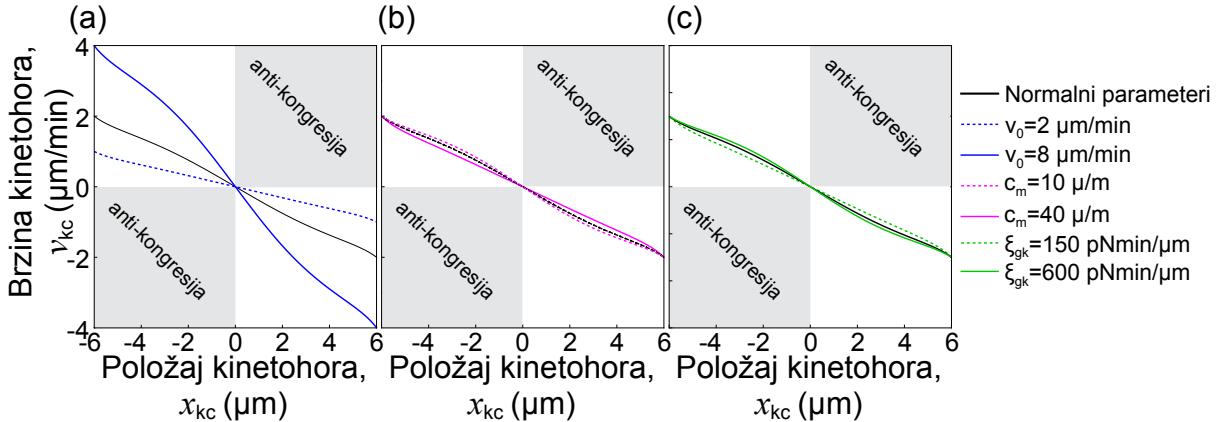
udaljenijeg pola. Shematski prikaz antiparalelnih preklopa se vidi u gornjem dijelu u slici 4.4(b).



Slika 4.8: Vremenski tijek prosječne duljine antiparalelnog preklopa (crne linije) i broja kinetohornih mikrotubula (zelene linije) za pozicije kinetohora kao u slici 4.7(a). Pune linije predstavljaju vrijednosti za desnu stranu, dok isprekidane linije predstavljaju vrijednosti za lijevu stranu. Parametri važni za raspodjelu mikrotubula su dani u Tablici I. Sheme prikazuju broj pričvršćenih kinetohornih mikrotubula i prosječnu duljinu antiparalelnog preklopa za početni i konačni položaj kinetohora. Slika prilagođena iz Ref. [107].

Za razumijevanje promjena broja motornih proteina tijekom kongresije kromosoma, korisno je proučiti vremenski tijek prosječne duljine antiparalelnog preklopa i broja kinetohornih mikrotubula. Ove dvije veličine ključne su jer izravno određuju broj motornih proteina (kao što je prikazano u jednadžbi (2.20)). Slika 4.8(a) pokazuje da je u početnoj poziciji broj kinetohornih mikrotubula na strani bližeg pola gotovo trostruko veći. Međutim, zbog znatne razlike u duljinama antiparalelnih preklopa između strane bližeg i udaljenijeg pola, broj motornih proteina ipak je veći na strani udaljenijeg pola. Tijekom približavanja kinetohora konačnoj poziciji, njihovo kretanje usporava, a broj kinetohornih mikrotubula i duljina antiparalelnih preklopa postupno se izjednačavaju na obje strane. Dakle, za standardni skup parametara kao u tablicama I i II, osim za $c_c = 0$ i $N_{CE} = 0$, motorni proteini generiraju sile prema centru vretena i tako mogu pokretati kongresiju kromosoma.

U predstavljenom modelu, motorni proteini generiraju sile usmjjerene prema ekvatorijalnoj ravnini, što posljedično pokreće kongresiju kromosoma. Kako bi se predočila učinkovitost centriranja, na slici 4.9 prikazana je ovisnost brzine kinetohora o njihovom položaju. Iz takvog prikaza ovisnosti brzine i položaja moguće je u jednom pogledu vidjeti hoće li za neki početni položaj kinetohore težiti prema centru. Tako na primjer ako su brzine kinetohora pozitivne za $x < 0$, a negativne za $x > 0$ kinetohore će ići prema cen-



Slika 4.9: Brzine kinetohora kao funkcije položaja kinetohora za originalne parametre, kao i za dvostruko veće i manje brzine motornih proteina, v_0 , (a), gustoće motornih proteina, c_m , (b) i efektivnog koeficijenta trenja između MT i kinetohora, ξ_{gk} , (c). Promjenjeni parametri dani su u legendi. Preostali parametri dani su u tablicama I i II, osim $c_c = 0$ i $N_{CE} = 0$. Siva područja predstavljaju izbor pozicija i brzina za koje će se kinetohore kretati prema bližem polu umjesto prema centru. Preostali parametri su dani u Tablicama I i II, osim za $c_c = 0$ i $N_{CE} = 0$. Slika prilagođena iz Ref. [107]

tru bez obzira na početni položaj. Na slici 4.9 su istraženi učinci povećanja i smanjenja vrijednosti triju relevantnih parametara za faktor 2: brzine motornih proteina bez opterećenja, gustoće motornih proteina i efektivnog koeficijenta trenja između mikrotubula i kinetohora. Vidljivo je da je brzina kinetohora uvijek usmjerena prema centru, neovisno o njihovom položaju ili promjenama parametara. Za kinetohore u blizini polova, iznos brzine približno je jednak $v_0/2$, a smanjuje se kako se kinetohore približavaju centru, gdje naposljeku dostiže nulu.

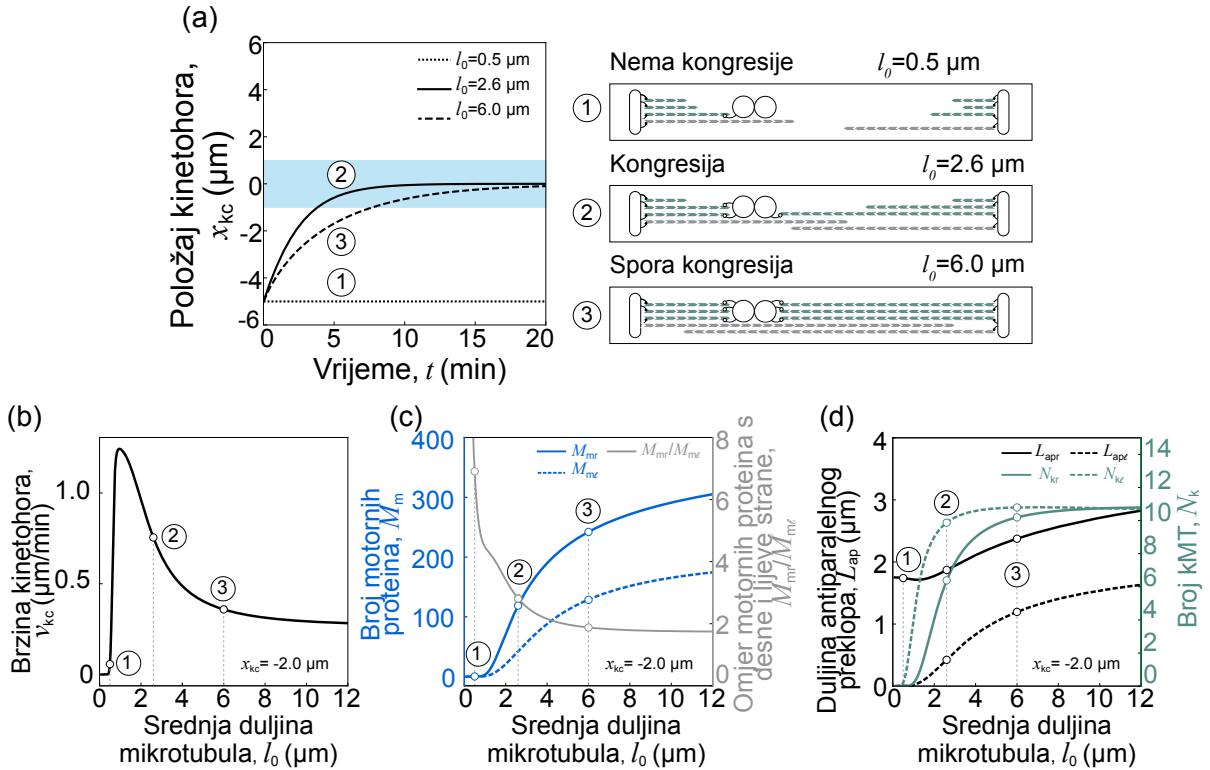
4.2.2 Učinkovitost centriranja ovisi o raspodjelama mikrotubula

Kako je bilo pokazano u slici 4.5, promjena prosječne duljine mikrotubula znatno mijenja doseg raspodjela mikrotubula, te time i duljine paralelnih i antiparalelnih preklopa, kao i broj kinetohornih mikrotubula. Slika 4.10(a) prikazuje rješenja modela koja pokazuju vremenski tijek pozicije kinetohore za kinetohore inicijalno na $x_{kc} = -5$, μm za tri različite prosječne duljine mikrotubula. Vidljivo je da nema kongresije za vrlo kratke mikrotubule (slučaj 1), te kinetohora ostaje na početnom položaju. Za mikrotubule normalne duljine (slučaj 2) i za dulje mikrotubule (slučaj 3), vidljiva je uspješna kongresija gdje kinetohore dosežu ekvatorsku ravninu (označenu svjetloplavim područjem) nakon otprilike 5-10 minuta, gdje je sporija kongresija povezana s duljim mikrotubulima. Slike 4.5(a) i (b)

prikazuju raspodjele kinetohornih i nekinetohornih mikrotubula za slučajeve 1 i 3, dok je raspodjela za slučaj 2 prikazana u slici 4.4(a). Radi jasnoće, shematski prikaz je dan u slici 4.10(a desno). Za kratke mikrotubule nema kinetohornih mikrotubula na strani udaljenijeg pola, što objašnjava izostanak kongresije. Za duže mikrotubule, postoji kinetohorni mikrotubuli s obje strane kinetohore, omogućujući kongresiju.

Izračuni brzine kinetohora kao funkcije duljine mikrotubula pokazuju da je za sve duljine brzina usmjerena prema centru (Slika 4.10(b)). Brzina kinetohore dostiže maksimalnu vrijednost za prosječnu duljinu mikrotubula oko $1 \mu\text{m}$. Analiza ovisnosti broja motornih proteina o prosječnim duljinama mikrotubula (Slika 4.10(b)) omogućuje bolje razumijevanje kako dolazi do postizanja maksimalne brzine kinetohore. Kod malih prosječnih duljina mikrotubula, broj motornih proteina na obje strane je nizak. S povećanjem duljine mikrotubula dolazi do porasta broja motornih proteina i posljedično njihove sile. Ova povećana sila nadvladava citoplazmatski otpor kromosoma, što rezultira većom brzinom kinetohore (vidi jednadžbu (4.3)). Međutim, daljnje produljenje mikrotubula uzrokuje smanjenje omjera broja motornih proteina na suprotnim stranama. To dovodi do smanjenja brzine kinetohore, unatoč povećanju ukupnog broja motornih proteina.

Kako bi se razumio odnos između broja motornih proteina i prosječne duljine mikrotubula, korisno je istražiti ovisnost prosječne duljine antiparalelnih preklopa i broja mikrotubula pričvršćenih za svaku kinetohoru o prosječnoj duljini mikrotubula. Naime, produkt prosječne duljine antiparalelnog preklopa i broja kinetohornih mikrotubula proporcionalan broju motornih proteina (vidi jednadžbu (2.20)). Za male prosječne duljine mikrotubula (ispod $2 \mu\text{m}$), uočava se razlika u duljini između lijevih i desnih preklopa (Slika 4.10(c)). Ova razlika ostaje prisutna i pri većim prosječnim duljinama mikrotubula, iako se obje duljine povećavaju. Nasuprot tome, na strani udaljenijeg pola, broj kinetohornih mikrotubula je manji za manje prosječne duljine mikrotubula, ali ta razlika postaje zanemariva iznad $6 \mu\text{m}$. Relativna razlika u broju kinetohornih mikrotubula na obje strane je manja u usporedbi s relativnom razlikom duljina antiparalelnih preklopa, i stoga je broj motornih proteina veći na strani udaljenijeg pola.



Slika 4.10: Brzina kongresije ovisi o prosječnoj duljini mikrotubula. (a) (lijevo) Rješenja modela koja pokazuju vremenski tijek pozicije kinetohore za kinetohore inicijalno na $x_{kc} = -5 \mu\text{m}$ za različite prosječne duljine mikrotubula: slučajevi s malom duljinom mikrotubula $l_0 = 0.5 \mu\text{m}$ (točkasta linija), normalnom duljinom mikrotubula $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$ (puna linija), velikom duljinom mikrotubula $l_0 = 6 \mu\text{m}$ (isprekidana linija) označeni su zaokruženim brojevima 1-3, redom. Svjetloplavo područje označava zonu ekvatorske ravnine diobenog vretna. (desno) Shematski prikaz broja kinetohornih mikrotubula koji odgovaraju trima prosječnim duljinama mikrotubula: bez mikrotubula na desnoj kinetohori (1), s nekoliko mikrotubula na desnoj kinetohori (2), te s jednakim brojem mikrotubula na obje kinetohore (3). (b) Ovisnost brzina kinetohora o prosječnim duljinama mikrotubula. (c) Broj motornih proteina na desnoj (puna plava linija) i lijevoj strani (isprekidana plava linija), i njihov omjer (siva linija) kao funkcija prosječne duljine mikrotubula. (d) Prosječna duljina antiparalelnog preklopa desnih (crna linija) i lijevih (isprekidana crna linija) kinetohornih mikrotubula, i broj kinetohornih mikrotubula (desna y-os) na desnoj (zelena linija) i lijevoj (isprekidana zelena linija) kinetohori kao funkcije prosječne duljine mikrotubula. U panelima (a-c) kinetohore su na poziciji $x_{kc} = -2 \mu\text{m}$. Zaokruženi brojevi 1, 2 i 3 pokazuju vrijednosti koje odgovaraju prosječnim duljinama mikrotubula kao u slučajevima iz panela (a). Preostali parametri su dani u Tablicama I i II, osim za $c_c = 0$ i $N_{CE} = 0$. Slika je prilagođena iz Ref. [107].

4.3 Sile koje stvaraju pasivni povezujući proteini ometaju kongresiju kromosoma

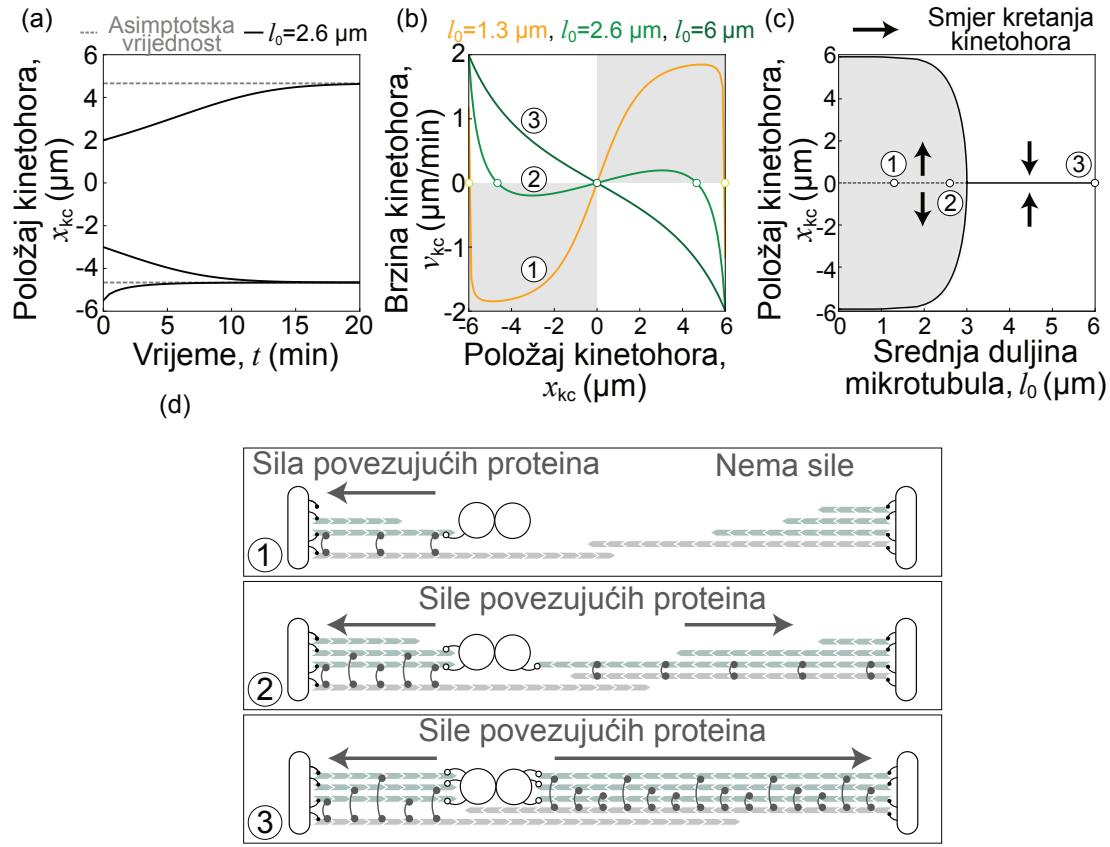
U prethodnom odjeljku pokazano je da motorni proteini distribuirani duž antiparalelnih regija pokreću kongresiju kromosoma. U ovom poglavlju se istražuje u kojoj mjeri pasivni povezujući proteini, koji se nakupljaju u paralelnim regijama, utječu na kongresiju kromosoma. Za razliku od motornih proteina, pasivni povezujući proteini ne mogu sami generirati aktivne sile, no svojim vezivanjem i odvezivanjem tvore efektivnu silu trenja između povezanih objekata, kako je objašnjeno u poglavlju 1.2.3. Tako, i u slučaju kada na kinetohornim mikrotubulima nema motornih proteina, povezujući proteini uzrokuju sile na kinetohorne mikrotubule prema polu zbog stalnog toka nekinetohornih mikrotubula.

4.3.1 Pasivni povezujući proteini imaju negativnu ulogu u centriranju kromosoma

Da bi se proučila uloga povezujućih proteina u kongresiji kromosoma, analizira se brzina kinetohora u granici gdje je broj motornih proteina na kinetohornim mikrotubulima, kao i broj kinetohornih motornih proteina jednak nuli ($M_{mr,m\ell} = 0$ i $N_{CE} = 0$). U tom slučaju se jednadžba (2.37) pojednostavljuje na:

$$v_{kc} = \frac{v_0 \frac{M_{cr}}{M_{cl}} - 1}{2 \frac{M_{cr}}{M_{cl}} + 1} \left[1 + \frac{\eta}{\xi_c} + \frac{\eta \xi_{gk}}{\xi_c^2 (M_{cr} + M_{cl})} \right. \\ \left. + \left(2 \frac{\xi_c}{\xi_{gk}} + \frac{\eta}{\xi_{gk}} \right) \frac{M_{cr} M_{cl}}{M_{cr} + M_{cl}} \right]^{-1} \quad (4.4)$$

Ova jednadžba poprima isti oblik kao i jednadžba kretanja u slučaju sa samo motornim proteinima, te se kinetohore kreću prema strani s većim brojem pasivnih povezujućih proteina. Međutim, budući da se pasivni povezujući proteini nakupljaju u paralelnim preklopima, a motorni proteini u antiparalelnim preklopima, njihove se distribucije razlikuju i tako mogu različito utjecati na kongresiju kromosoma. Numerički izračuni pokazuju da za biološki relevantne duljine mikrotubula kinetohore pod utjecajem sila pasivnih povezujućih ne prilaze središtu diobenog vretena, u slučaju bez motornih proteina na kinetohornim mikrotubulima proteina. Umjesto toga, asimptotski se približavaju jednoj od dvije stabilne točke smještene blizu polova, gdje točka kojoj se kinetohore približavaju ovisi o njihovom početnom položaju. (Slika 4.11(a)).



Slika 4.11: Ovisno o duljini mikrotubula, pasivni povezujući proteini proizvode sile koje se suprotstavljaju kongresiji kromosoma. (a) Vremenski tijek pozicije kinetohora (crne linije) pokretanih povezujućim proteinima (bez motornih proteinima na kinetohornim mikrotubulima) za tri različite početne pozicije, $x_{kc} = -5 \mu\text{m}$, $x_{kc} = -3 \mu\text{m}$ i $x_{kc} = 2 \mu\text{m}$. Kinetohore se približavaju jednoj od dvije asimptotske pozicije ovisno od početne pozicije (sive isprekidane linije). (b) Ovisnost brzine kinetohore o poziciji kinetohore duž diobenog vretena mikrotubula pokretanih povezujućim proteinima (bez motornih proteinima na kinetohornim mikrotubulima) za tri različite prosječne duljine mikrotubula: kratki mikrotubuli $l_0 = 1.3 \mu\text{m}$ (slučaj 1, narančasta linija), normalne duljine mikrotubula $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$ (slučaj 2, zelena linija) i dugi mikrotubuli $l_0 = 6 \mu\text{m}$ (slučaj 3, tamnozelena linija). Siva područja predstavljaju izbor pozicija i brzina za koje će se kinetohore kretati prema bližem polu. Bijele točke predstavljaju stabilne fiksne točke za različite prosječne duljine mikrotubula. (c) Pozicije stabilnih (crna puna linija) i nestabilnih (crna isprekidana linija) fiksnih točaka kretanja kinetohora u slučaju sa samo pasivnim povezujućim proteinima na kinetohornim mikrotubulima za različite prosječne duljine mikrotubula. Sivo područje predstavlja izbor pozicija i duljina mikrotubula za koje će se kinetohore kretati prema bližem polu. Smjer kretanja kinetohore označen je crnim strelicama. (d) Shematski prikaz kako povezujući proteini (crni piktogrami) mogu proizvesti kretanje od centra, kao u slučajevima 1 i 2 (gore), i prema centru, kao u slučaju 3 (dolje). Preostali parametri su dani u Tablicama I i II, osim za $c_m = 0$ i $N_{CE} = 0$. Slika je prilagođena iz Ref. [107]

4.3.2 Promjena stabilnosti centralne točke i pojava bifurkacije

Na slici 4.5, gdje je mijenjana prosječna duljina mikrotubula, jasno se vidi da se duljina preklopa mikrotubula, a time i broj povezujućih proteina, mijenjaju s duljinom mikrotubula. Kako bi se istražio utjecaj promjene duljine mikrotubula na kretanje kinetohora, izračunata je ovisnost brzine kinetohore o njenom položaju za različite vrijednosti prosječne duljine mikrotubula (Slika 4.11(b)). U slučaju s mikrotubulima normalne duljine i kratkim mikrotubulima, brzina kinetohora mijenja predznak u točki između pola i središta diobenog vretena, te kinetohore idu prema toj točki. S druge strane, za dulje mikrotubule, brzina kinetohora je uvijek usmjerena prema središtu.

Točka x_f za koju vrijedi $v(x_f) = 0$ naziva se fiksnom točkom. Ako u toj točki vrijedi $\frac{dv}{dx} < 0$, tada je riječ o stabilnoj točki, odnosno objekt koji je iz nje izmaknut ponovno se vraća u nju. Više o istraživanju stabilnosti centriranja je dano u Dodatku G. Tako na primjer na slici 4.11(b), za prosječne duljine mikrotubula $l_0 = 1.3 \mu\text{m}$ i $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$ postoje dvije stabilne točke simetrično postavljene u odnosu na nestabilnu točku smještenu u središtu. Za veće prosječne duljine mikrotubula, $l_0 = 6 \mu\text{m}$, središnja lokacija mijenja stabilnost i postaje jedinstvena stabilna fiksna točka kojoj se kinetohore približavaju bez obzira na njihov početni položaj.

Takva promjena stabilnosti ukazuje na postojanje bifurkacije. Bifurkacija se događa kada mala promjena parametara sustava uzrokuje naglu 'kvalitativnu' ili topološku promjenu u ponašanju sustava [119]. Tako, u primjeru s pasivnim povezujućim proteinima, promjena duljine mikrotubula uzrokuje promjenu stabilnosti središnje točke. Zanimljivo je detaljnije istražiti kako broj i položaj fiksnih točaka ovisi o srednjoj duljini mikrotubula. Iz prikaza na slici 4.11(c) vidljivo je da sustav prolazi kroz superkritičnu račvastu bifurkaciju, u kojoj jedna stabilna točka prelazi u nestabilnu, uz pojavu dvije nove stabilne točke. U ovom slučaju, iznad kritične duljine mikrotubula postoji samo jedna stabilna fiksna točka u središtu, dok ispod kritične duljine mikrotubula središnja fiksna točka postaje nestabilna, a prijelaz u stabilnosti praćen je pojmom dvije stabilne fiksne točke. Kritična duljina mikrotubula pri kojoj se događa promjena stabilnosti može se odrediti kao vrijednost duljine za koju je $\frac{dv_{kc}}{dx} = 0$, te je za slučaj sa samo pasivnim povezujućim proteinima na kinetohornim mikrotubulima utvrđeno da je kritična duljina mikrotubula $l^* \approx 3 \mu\text{m}$.

Da bismo dobili intuitivno objašnjenje zašto fiksna točka u središtu mijenja svoju stabilnost, u slici 4.11(d) prikazujemo reprezentaciju distribucija mikrotubula za tri različite prosječne duljine mikrotubula. Ova reprezentacija naglašava aspekte raspodjela mikrotubula koje treba uočiti u slikama 4.4 i 4.5. Za male prosječne duljine mikrotubula, mikrotubuli ne dosežu kinetohore s udaljene strane pola, dok sa strane bližeg pola mikro-

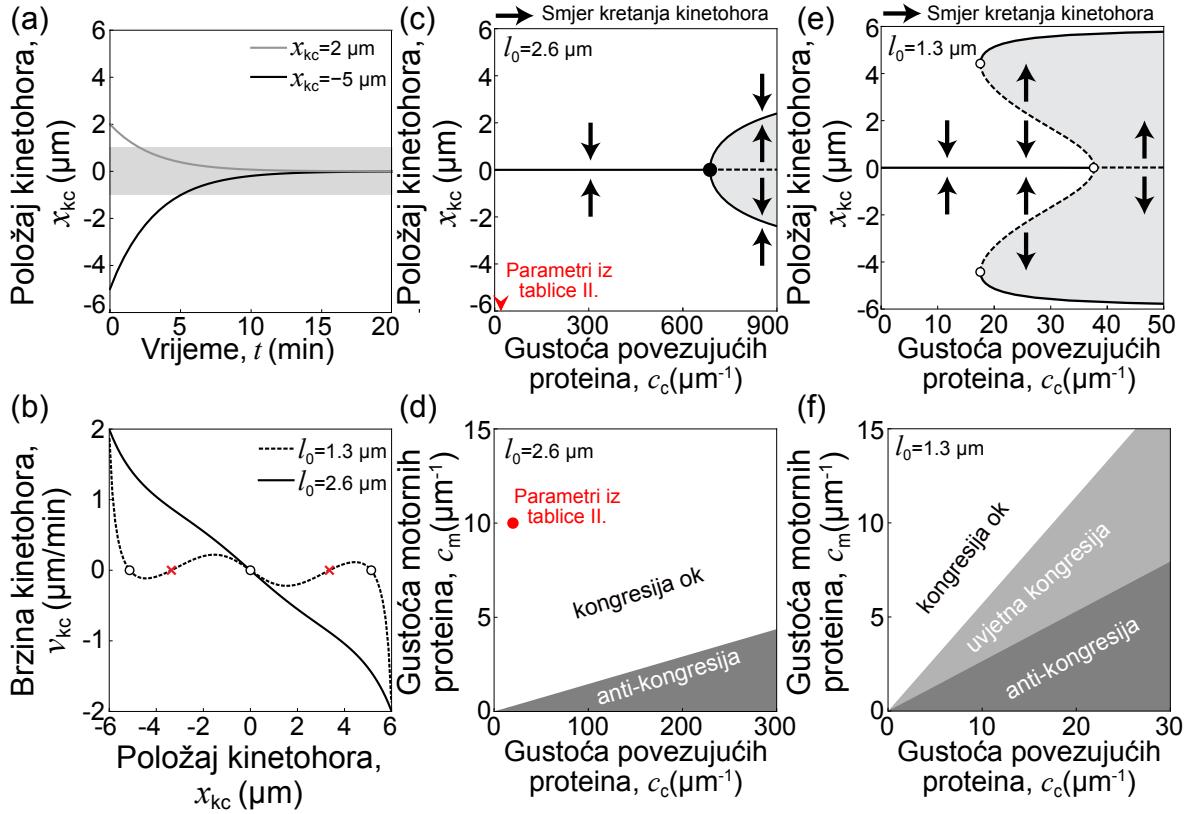
tubuli dosežu kinetohoru (slučaj 1, te slika 4.5(a)). U ovom slučaju pasivni povezujući proteini se nakupljaju unutar paralelnog preklopa samo na strani bližeg pola i tako generiraju silu koja udaljava od središta. Kako se prosječna duljina mikrotubula povećava, mikrotubuli dosežu kinetohoru s udaljene strane pola, te se povezujući proteini nakupljaju na obje strane. To rezultira silama sličnih iznosa na obje kinetohore (slučaj 2, te slika 4.4.). Za velike prosječne duljine mikrotubula, broj kinetohornih mikrotubula postaje sličan na obje strane, pa duži preklop na strani udaljenijeg pola nakuplja više povezujućih proteina stvarajući silu prema centru (slučaj 3, te slika 4.5(b).).

4.4 Sile motornih proteina i povezujućih proteina određuju smjer kretanja kromosoma

U prethodnim odjeljcima zasebno su istraženi utjecaji motornih proteina i povezujućih proteina na kongresiju kromosoma, dok u stvarnim biološkim sustavima oni djeluju zajedno, te je potrebno istražiti njihov kombinirani doprinos tom procesu. Za biološki relevantne parametre, kinetohore koje su inicijalno bile pomaknute iz centra diobenog vretena približavaju mu se u nekoliko minuta (Slika 4.12(a)). Ovaj ishod se događa bez obzira na početne uvjete, za kinetohore blizu pola i one bliže centru. Dinamika ovog procesa slična je onoj u slučaju bez povezujućih proteina (Slika 4.7(a)), što implicira da motorni proteini generiraju dominantne sile tijekom kongresije kromosoma.

4.4.1 Ovisno o duljini mikrotubula i gustoći povezujućih proteina mijenja se stabilnost centriranja

U poglavlju 4.3 je naglašeno kako prikaz ovisnosti brzine o položaju daje uvid o stabilnosti centriranja, te da pasivni povezujući proteini prouzrokuju jaču silu koja udaljava od centra za kraće mikrotubule (usp. sliku 4.11(b)). Da bismo istražili kako brzina kinetohora ovisi o njihovoj poziciji kada su prisutni i motorni proteini i povezujući proteini, prikazujemo ovu ovisnost za dvije različite vrijednosti prosječnih duljina mikrotubula (Slika 4.12(b)). Za parametre kao u Tablicama I i II, sve brzine su usmjerene prema stabilnoj središnjoj poziciji. Međutim, za manje prosječne duljine mikrotubula, postoje tri stabilne fiksne točke i dvije nestabilne fiksne točke smještene između susjednih stabilnih fiksnih točaka, što dovodi do povećane složenosti u kretanju kinetohora. Iz ovoga je vidljivo da, premda centrirajući utjecaj motornih proteina oko središta i dalje prevladava, jačanje sile pasivnih povezujućih proteina usmjerenih prema bližem polu dovodi do pojave intervala

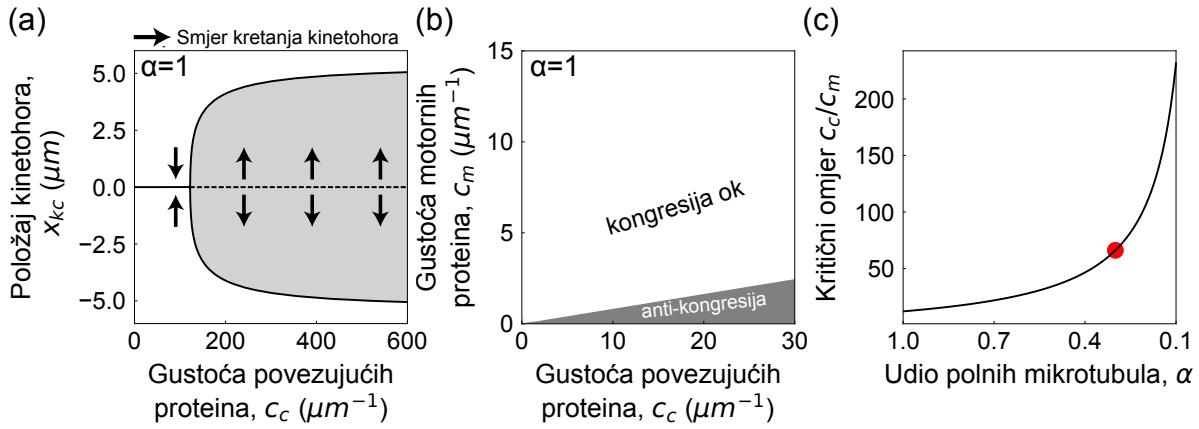


Slika 4.12: Međudjelovanje sila motornih proteina i povezujućih proteina regulira učinkovitost kongresije kromosoma. (a) Rješenja modela koja pokazuju vremenski tijek položaja kinetohore za kinetohore početno na $x = 2 \mu\text{m}$ (siva linija) i $x = -5 \mu\text{m}$ (crna linija). Sivo područje označava zonu ekvatora diobenog vretena. (b) Ovisnost brzine kinetohore o položaju kinetohore za dvije različite duljine mikrotubula $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$ (crna linija) i $l_0 = 1.3 \mu\text{m}$ (isprekidana linija). Kružići predstavljaju stabilne fiksne točke, dok crveni simbol "x" označava nestabilne fiksne točke. (c) Položaj stabilnih (puna crna linija) i nestabilnih (isprekidana crna linija) točaka za različite prosječne gustoće povezujućih proteina i duljinu mikrotubula $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$. Strelica na x-osi predstavlja gustoću povezujućih proteina c_c danu u Tablici II. Smjer kretanja kinetohore označen je crnim strelicama. (d) Fazni dijagram koji prikazuje područje u kojem se događa kongresija za različite gustoće povezujućih proteina i motornih proteina za duljinu mikrotubula $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$. Prijelazna linija javlja se pri $c_m \approx 0.019 c_c$. Crvena točka predstavlja vrijednosti gustoće dane u Tablici II. (e) Položaj stabilnih (puna crna linija) i nestabilnih točaka (isprekidana crna linija) za različite prosječne gustoće povezujućih proteina i duljinu mikrotubula $l_0 = 1.3 \mu\text{m}$. (f) Fazni dijagram koji prikazuje područje u kojem se događa kongresija za različite gustoće povezujućih proteina i motornih proteina i duljinu mikrotubula $l_0 = 1.3 \mu\text{m}$. Dvije prijelazne linije javlja se pri $c_m \approx 0.67 c_c$ i $c_m \approx 0.29 c_c$. Smjer kretanja kinetohore označen je crnim strelicama. Preostali parametri dani su u Tablicama I i II, osim za $N_{CE} = 0$. Slika prilagođena iz Ref. [107].

položaja unutar kojeg će se kinetohore, ako se u njemu nađu, gibati prema stabilnoj točki smještenoj u blizini toga pola.

S druge strane, iz slike 4.11 je očito da i za mikrotubule s prosječnom duljinom kao u tablici I, kinetohore se kreću prema bližem polu za određene vrijednosti gustoće pasivnih proteina. Zato je korisno vidjeti pri kojoj gustoći pasivnih povezujućih proteina njihov doprinos postaje dominantan, što za posljedicu ima da se stabilna točka kinetohora pomiče prema polovima, umjesto prema centru (Slika 4.12(c)). Za širok raspon gustoća povezujućih proteina, središnja pozicija je jedina fiksna točka i sve kinetohore se kreću prema njoj, bez obzira na početnu poziciju. Kada koncentracija premaši kritičnu vrijednost od $c_c \approx 66.2 \times c_m$, središnja lokacija postaje nestabilna, a dvije nove stabilne fiksne točke se pojavljuju simetrično u odnosu na centar, što je karakteristika superkritične račvaste bifurkacije. Kritična vrijednost je dobivena numeričkim računom iz jednadžbe (G.5), gdje je vidljivo da je kritična gustoća povezujućih proteina, za koju središnja fiksna točka mijenja svoju stabilnost, linearno proporcionalna gustoći motornih proteina. Ta linearna ovisnost u prostoru parametara za koji se događa kongresija je prikazana u slici 4.12(d). Za vrijednosti ispod kritične gustoće povezujućih proteina, kongresija se normalno odvija, dok se za vrijednosti iznad nje kromosomi udaljavaju od centra.

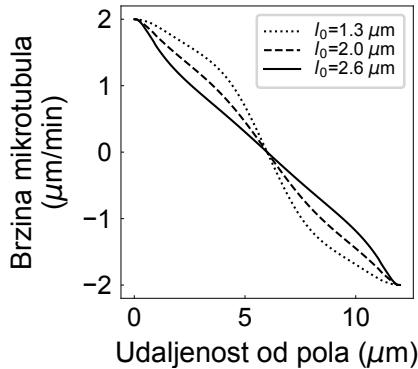
Kako bi se bolje razumjela složena dinamika kinetohora za manje prosječne duljine mikrotubula (Slika 4.12(b)), potrebno je istražiti prijelaze koji se događaju u ovom području prostora parametara. Kao i u prethodnoj slici, koristeći gustoću povezujućih proteina kao kontrolni parametar, prikazana je pozicija stabilnih i nestabilnih fiksnih točaka (Slika 4.12(e)). Rezultati pokazuju subkritičnu račvastu bifurkaciju, gdje nestabilna fiksna točka postaje stabilna, a dvije nove nestabilne fiksne točke se pojavljuju kako se gustoća povezujućih proteina smanjuje. Za iste gustoće povezujućih proteina postoje dvije stabilne fiksne točke i one koegzistiraju s nestabilnim fiksnim točkama, s obje strane bifurkacije. Ovisno o broju stabilnih fiksnih točaka, moguće je identificirati tri različita područja u prostoru parametara (Slika 4.12(f)). Ovi rezultati sugeriraju da, kada postoji više od jedne stabilne fiksne točke, kongresija ne uspijeva i kinetohore mogu biti stabilno smještene i blizu polova i u centru.



Slika 4.13: Udio polnih mikrotubula u vretenu, α , određuje osjetljivost kongresije na promjenu omjera gustoće motornih i povezujućih proteina. (a) Pozicije stabilnih (crna puna linija) i nestabilnih (crna isprekidana linija) fiksnih točaka za različite gustoće pasivnih povezujućih proteina za udio polnih mikrotubula $\alpha = 1$. Sivo područje predstavlja izbor pozicija i duljina mikrotubula za koje će se kinetohore kretati prema bližem polu. Smjer kretanja kinetohore označen je crnim strelicama. (b) Fazni dijagram koji prikazuje područje u kojem se događa kongresija za različite gustoće povezujućih proteina i motornih proteina za udio polnih mikrotubula u vretenu $\alpha = 1$. Prijelazna linija javlja se pri $c_m \approx 0.08 c_c$. (c) Ovisnost kritične gustoće povezujućih proteina o udjelu polnih mikrotubula u vretenu. Crvena točka odgovara udjelu polnih mikrotubula iz tablice I

4.4.2 Udio polnih mikrotubula u vretenu određuje osjetljivost kongresije na promjenu omjera gustoće motornih i povezujućih proteina

Osim srednje duljine mikrotubula, na njihov doseg unutar diobenog vretena značajno utječe i omjer broja mikrotubula nukleiranih na polu u odnosu na ukupan broj mikrotubula, α , kako se i vidi na slici 4.6. Zato se može očekivati da će parametar α utjecati na osjetljivost kongresije na promjenu gustoće pasivnih povezujućih proteina (Slika 4.13). Na slici 4.13(a) se vidi da je za $\alpha = 1$ vrijednost gustoće pasivnih povezujućih proteina pri kojoj dolazi do bifurkacije smanjena u odnosu na gustoću pasivnih povezujućih proteina na slici 4.12(c), ali se tip bifurkacije nije promijenio. Nova vrijednost kritične koncentracije povezujućih proteina, iznad koje kinetohore teže stabilnim točkama blizu polova, iznosi $c_c \approx 12 \times c_m$. To je oko pet puta manja od koncentracije za vretena s parametrima iz tablice I (slika 4.12(c)), a ipak oko šest puta veća koncentracija povezujućih proteina od najmanje vrijednosti za koju se pojavljuju stabilne točke blizu polova (slika 4.12(e)). Ta razlika u kritičnoj vrijednosti se očituje u smanjenju područja uspješne kongresije (slika



Slika 4.14: Brzina kinetohora kao funkcija položaja kinetohora za prilagođene raspodjele minus krajeva mikrotubula kao u Dodatku F i duljine mikrotubula $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$ (puna linija), $l_0 = 2 \mu\text{m}$ (iscrtkana linija) i $l_0 = 1.3 \mu\text{m}$ (točkasta linija)

4.13(b)). Povećavanjem udjela mikrotubula nukleiranih duž drugih mikrotubula u ukupnom broju mikrotubula kritična vrijednost gustoće pasivnih povezujućih proteina naglo raste, što se dobije iz jednadžbe (G.5).

4.4.3 Višestruke stabilne točke opažene u eksperimentima u skladu s teorijskim predviđanjima

U eksperimentima sa stanicama u kojima su izmijenjene koncentracije CENP-E proteina, kromosomi se mogu nalaziti u metafaznoj ravnini ili blizu polova [55]. Takva stanja mogu potrajati dugo, čak i nakon inhibicije Aurore B koja odvaja kinetohorne mikrotubule pri niskoj interkinetohornoj napetosti, što sugerira postojanje nekoliko stabilnih lokacija duž diobenog vretena gdje kinetohore imaju tendenciju nakupljati se. Model iz ovog rada predviđa da se može pojaviti režim s višestrukim stabilnim točkama. Na primjer, u diobenim vretenima s malom prosječnom duljinom mikrotubula zajedno postoji stabilne točke u središtu i blizu pola, a kinetohore se približavaju jednoj od njih ovisno o početnom položaju (4.12(b), (e) and (f)). Detaljnija usporedba teorijskih predviđanja i eksperimenata koji kvantificiraju distribuciju mikrotubula vezanih za kinetohore pružit će dublji uvid u mehanizme koji pomažu u ispravljanju ovih pogrešnih stanja.

4.4.4 Prilagođena raspodjela minus krajeva pozitivno utječe na kongresiju kromosoma

U poglavlju 4.1 je pokazano da je raspodjela minus krajeva mikrotubula bolje opisana Gaussovom raspodjelom kao u Dodatku F. Pomicanjem raspodjela minus krajeva od pola može se očekivati da će se zbog daljeg dosega plus krajeva povećati uspješnost kongresije kromosoma i u slučaju kraćih mikrotubula. Na slici 4.14 prikazana je ovisnost brzina o položaju kinetohora za prosječne duljine mikrotubula $l_0 = 2.6 \mu\text{m}$, $l_0 = 2 \mu\text{m}$ i $l_0 = 1.3 \mu\text{m}$. Za sve duljine mikrotubula, kinetohore imaju brzinu prema središtu diobenog vretena s vrlo malim varijacijama u brzinama. U usporedbi sa slikom 4.12(b), pri duljini mikrotubula $l_0 = 1.3 \mu\text{m}$ gibanje kinetohora pokazuje višestruke stabilne točke te se ne mogu kongregirati. Ovo sugerira da promjena raspodjele minus krajeva mikrotubula pozitivno utječe na kongresiju kromosoma.

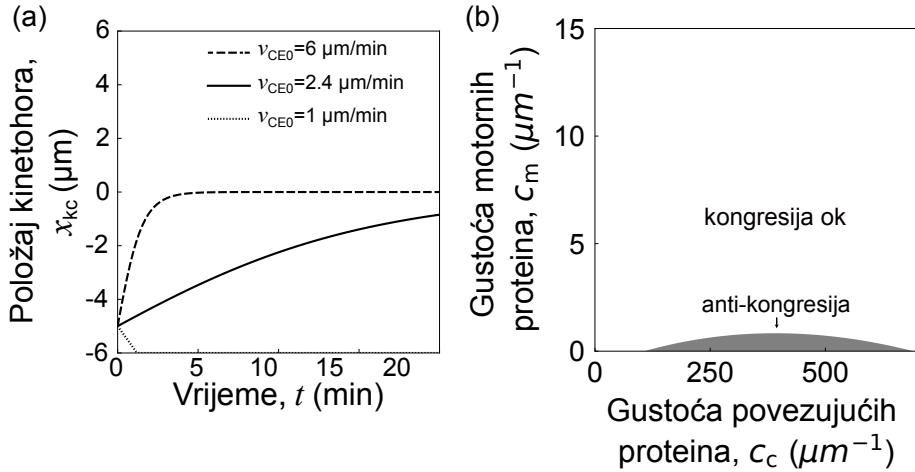
4.5 Kinetohorni motorni proteini usmjereni prema plus kraju pomažu kongresiji kromosoma

Uz motorne proteine i pasivne povezujuće proteine, model također opisuje kinetohorne motorne proteine koji doprinose kongresiji kromosoma transportirajući kromosome duž mikrotubula prema njihovim plus krajevima. Radi fokusa na utjecaj kinetohornih motornih proteina na kongresiju kromosoma, broj motornih proteina i pasivnih povezujućih proteina u jednadžbi (2.37) postavljen je na nulu, što daje pojednostavljeni izraz za brzinu kinetohore:

$$v_{\text{kc}} = \left(v_{\text{CEO}} - \frac{v_0}{2} \right) \frac{\frac{N_\ell}{N_r} - 1}{\frac{N_\ell}{N_r} + 1} \left[1 + \frac{\eta v_{\text{CEO}}}{2N_{CE}f_{\text{CEO}}} \right]^{-1}. \quad (4.5)$$

Ovdje se može vidjeti da smjer brzine kinetohore ovisi o razlici između brzine kinetohornog motornog proteina bez opterećenja i brzine toka nekinetohornih mikrotubula. Ovo sugerira da je kongresija kromosoma pokretana kinetohornim motornim proteinima moguća kada su ti motori brži od polarnog toka, što pruža objašnjenje za različite smjerove kretanja kromosoma na Slici 4.15(a).

Daljnja analiza pokazuje da brzina kinetohore može biti usmjereni prema središtu, ali postoje i parametri za koje to nije slučaj. Kad se gustoće motora i pasivnih povezujućih proteina u jednadžbi (G.4) stave u nulu, stabilnost središnje točke je određena predznakom



Slika 4.15: Kongresija kromosoma sa samo kinetohornim motornim proteinima i u kombinaciji s drugim proteinima. (a) Rješenja modela koja pokazuju vremenski tijek položaja kinetohore pokretane kinetohornim motornim proteinima koji utječu na mikrotubule kinetohore počevši od \$x_{kc} = -5 \mu\text{m}\$ za različite brzine bez opterećenja kinetohornih motornih proteinima. Slika prilagođena iz [107]. (b) Fazni dijagram koji pokazuje područje u kojem se događa kongresija za različite gustoće pasivnih povezujućih proteina i motornih proteina na kinetohornim mikrotubulima, te brojem motornih proteina na kinetohorama kao u Tablici II. Preostali parametri dani su u Tablicama I i II.

umnoška \$(v_{CE0} - \frac{v_0}{2}) P'_\ell(0)\$. Potrebna derivacija se računa kao

$$P'_\ell = \frac{N'_\ell N_r - N_\ell N'_r}{(N_\ell + N_r)^2}. \quad (4.6)$$

Uvrštenjem izraza za \$N_\ell\$ i \$N_r\$ izračunatih iz jednadžbe (3.10) na položaju \$x_{kc} = 0\$ dobiva se:

$$P'_\ell = \frac{-\frac{1}{l_0} + \left(1 - \frac{L}{2l_0}\right) \left(\frac{k_{nc}}{k_{ps}} + \frac{k_{nc}}{k_{cat}}\right)}{2\left(1 + \frac{L}{2} \left(\frac{k_{nc}}{k_{ps}} + \frac{k_{nc}}{k_{cat}}\right)\right)}, \quad (4.7)$$

Iz ove jednadžbe može se vidjeti da kada nema nukleacije duž postojećih mikrotubula ili za \$l_0 < L/2\$ vrijedi \$P'_\ell < 0\$. U tom slučaju, ako je \$v_{CE} > v_0/2\$, doprinosi kinetohornih motornih proteina sili koja pokreće gibanja kromosoma usmjereni su prema središtu. S druge strane, ako nukleacija duž postojećih mikrotubula zadovoljava \$k_{nc} > \frac{k_{ps}k_{cat}}{k_{ps}+k_{cat}} \frac{1}{l_0-L/2}\$ i ako je \$l_0 > L/2\$, dobiva se \$P'_\ell > 0\$. U tom slučaju, ako je \$v_{CE} > v_0/2\$, doprinosi kinetohornih motornih proteina sili koja pokreće gibanja kromosoma usmjereni su prema polovima u području oko središta vretena.

Za istraživanje međudjelovanja kinetohornih motornih proteina s motornim i povezućim proteinima, izrađen je fazni dijagram u kojem su mijenjane gustoće pasivnih povezujućih proteina, kao i motornih proteina (Slika 4.15(b)). Rezultati pokazuju da do kongresije kromosoma dolazi u velikom rasponu parametara. Usporedba sa slikom 4.12(d) (Na kojoj je broj motornih proteina na kinetohorama nula) otkriva da se područje parametarskog prostora u kojem dolazi do kongresije proširuje kada su prisutni kinetohorni motorni proteini, što upućuje na njihov pozitivan doprinos kongresiji kromosoma. U istoj slici 4.12(d) je vidljivo da ovisnost kritične koncentracije pasivnih povezujućih proteina nije linearna kao u primjerima bez kinetohornih motornih proteina. Ovisnost kritične koncentracije pasivnih povezujućih proteina dana je implicitno u jednadžbi:

$$0 = f_0 M'_{\text{mr}}(0) + v_0 \xi_c M'_{\text{cr}}(0) + (1 + \frac{\beta_r}{\xi_{\text{gk}}})^2 \frac{1 - \frac{v_0/2}{f_{\text{CEO}}}}{f_{\text{CEO}}} 4N_{\text{CE}} P'_\ell(0), \quad (4.8)$$

gdje je korištena pokrata od ranije $\beta_{r,\ell} = M_{\text{mr},\ell} \frac{f_0}{v_0} + M_{\text{cr},\ell} \xi_c$.

5. Kretanje kromosoma za diskretnu raspodjelu mikrotubula

Pristup srednjeg polja dobro opisuje sustav s velikim brojem mikrotubula te pruža uvid u glavne karakteristike kretanja kromosoma pokretanih opisanim mehanizmima. Kako bi se analizirala varijabilnosti u kretanju kromosoma koja proizlazi iz stohastičkih efekata vezivanja i odvajanja mikrotubula na kinetohorama, mogu se koristiti stohastičke simulacije, te će u ovom poglavlju biti prikazane simulacije kretanja kromosoma za diskretnu raspodjelu kinetohornih mikrotubula.

5.1 Opis raspodjele kinetohornih mikrotubula master jednadžbom

Dok pristup srednjeg polja tretira broj mikrotubula kao kontinuiranu varijablu, stvarni biološki sustav ima diskretan broj mikrotubula vezanih na kinetohore. U ljudskim stanicama broj vezivnih mesta na kinetohorama je oko 15, a elektronska mikroskopija otkriva da je oko 9 mikrotubula prikvačeno na kinetohore u metafazi [24]. U takvima uvjetima, stohastičke fluktuacije u broju vezanih mikrotubula mogu utjecati na dinamiku sustava.

Kako bi se preciznije opisao ovakav sustav, bit će korištena master jednadžba koja opisuje vremensku evoluciju vjerojatnosti nalaženja sustava u određenom stanju. U slučaju kinetohornih mikrotubula, $P(N_{\text{kr}}, t)$ je vjerojatnost da je u trenutku t na kinetohoru vezano točno N_{kr} mikrotubula. Master jednadžba uzima u obzir sve moguće prijelaze između stanja s različitim brojem vezanih mikrotubula, uključujući i stohastičku prirodu procesa vezivanja i odvajanja. Za N_0 vezivnih mesta promjena vjerojatnosti da je prikvačeno N_{kr}

mikrotubula u trenutku t se može računati kao:

$$\begin{aligned} \frac{dP(N_{\text{kr}}, t)}{dt} = & k_{\text{on}}(N_0 - (N_{\text{kr}} - 1))P(N_{\text{kr}} - 1, t) \\ & + k_{\text{off}}(N_{\text{kr}} + 1)P(N_{\text{kr}} + 1, t) \\ & - [k_{\text{on}}(N_0 - N_{\text{kr}}) + k_{\text{off}}N_{\text{kr}}]P(N_{\text{kr}}, t). \end{aligned} \quad (5.1)$$

Prva dva člana s desne strane opisuju povećanje vjerojatnosti. Prvi član opisuje vjerojatnost da kinetohora ima $N_{\text{kr}} - 1$ mikrotubula, gdje je stopa prikvačivanja k_{on} pomnožena s brojem slobodnih vezivnih mesta na kinetohori. Drugi član opisuje vjerojatnost da kinetohora ima $N_{\text{kr}} + 1$ mikrotubula, gdje je stopa otkvačivanja k_{off} pomnožena s brojem vezanih mikrotubula. Zadnji član opisuje smanjenje vjerojatnosti zbog prijelaza iz stanja s N_{kr} mikrotubula u stanja s $N_{\text{kr}} - 1$ ili $N_{\text{kr}} + 1$ mikrotubula. U toj jednadžbi su zanemareni viši doprinosi u vjerojatnosti prikvačivanja i otkvačivanja, koji opisuju događaje npr. gdje se u jednom intervalu vremena Δt mikrotubul prikvači, otkvači pa opet prikvači. Te više doprinose moguće je zanemariti za dovoljno mali Δt za koje su $p_{\text{on}} = (1 - \exp(-k_{\text{on}}\Delta t))$ i $p_{\text{off}} = (1 - \exp(-k_{\text{off}}\Delta t))$ mnogo manji od 1.

Ako se pomnože obje strane jednadžbe (5.1) s N_{kr} i zbroje od 0 do N_0 , nakon prilagodbe, suma se može zapisati kao:

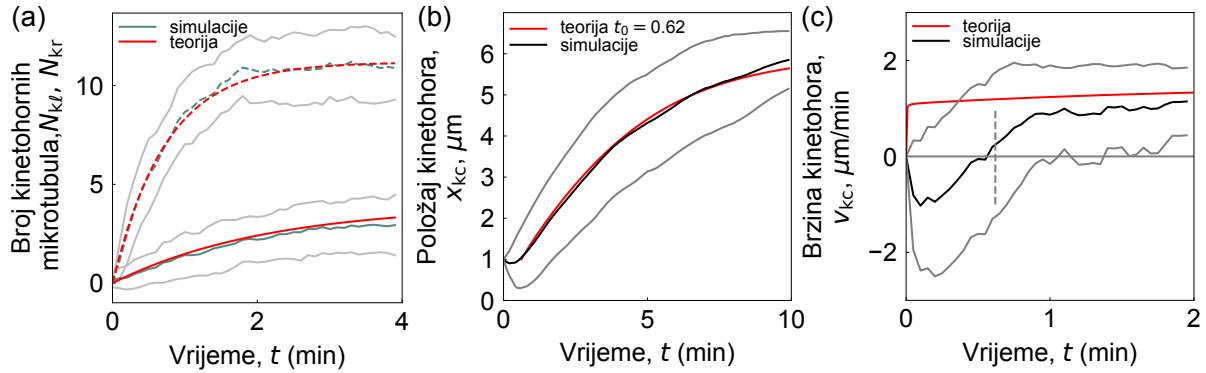
$$\begin{aligned} \sum_{N_{\text{kr}}=0}^{N_0} N_{\text{kr}} \frac{dP(N_{\text{kr}}, t)}{dt} = & \sum_{N_{\text{kr}}=0}^{N_0} k_{\text{on}}(N_0 - N_{\text{kr}})(N_{\text{kr}} + 1)P(N_{\text{kr}} - 1, t) \\ & + \sum_{N_{\text{kr}}=0}^{N_0} k_{\text{off}}(N_{\text{kr}})(N_{\text{kr}} - 1)P(N_{\text{kr}} + 1, t) \\ & - \sum_{N_{\text{kr}}=0}^{N_0} [k_{\text{on}}(N_0 - N_{\text{kr}}) + k_{\text{off}}N_{\text{kr}}] N_{\text{kr}} P(N_{\text{kr}}, t) \end{aligned} \quad (5.2)$$

Iz definicije srednje vrijednosti $\overline{N_{\text{kr}}} = \sum_{N_{\text{kr}}=0}^{N_0} N_{\text{kr}} P(N_{\text{kr}}, t)$ proizlazi:

$$\frac{d\overline{N_{\text{kr}}}}{dt} = k_{\text{on}}N_0\left(1 - \frac{\overline{N_{\text{kr}}}}{N_0}\right) - k_{\text{off}}\overline{N_{\text{kr}}}. \quad (5.3)$$

Usporedbom ove jednadžbe s (E.1) dobiva se

$$k_{\text{on}} = \frac{v_g n_r p_{\text{att}}}{N_0}. \quad (5.4)$$



Slika 5.1: Usporedba rezultata pristupa srednjeg polja i simulacije. (a) Prikaz broja prikvačenih mikrotubula na desnoj (pune linije) i lijevoj (iscrtkane linije) kinetohori, za kinetohore u fiksnom položaju $x_{kc} = -5\mu\text{m}$. Zelenom bojom su označene srednje vrijednosti dobivene iz simulacija usrednjenjem po pedeset prolaza, a crvenom bojom rezultati pristupa srednjeg polja. Siva područja označuju standardnu devijaciju rezultata simulacije. (b) Prikaz ovisnosti položaja kinetohora u vremenu za kinetohore u početnom položaju $x_{kc} = -5\mu\text{m}$. Crnom bojom su označene srednje vrijednosti dobivene iz simulacija usrednjenjem po pedeset prolaza, a crvenom bojom rezultati pristupa srednjeg polja. Siva područja označuju standardnu devijaciju rezultata simulacije. Rezultati pristupa srednjeg polja su pomaknuti u vremenu za $t = 0.62$ min koje je srednje vrijeme potrebno da se na desnoj kinetohori nađe 1 mikrotubul. (c) Prikaz ovisnosti brzine kinetohora o vremenu za fiksni položaj $x_{kc} = -5\mu\text{m}$. Crnom bojom su označene srednje vrijednosti dobivene iz simulacija usrednjenjem po pedeset prolaza, a crvenom bojom rezultati pristupa srednjeg polja. Siva područja označuju standardnu devijaciju rezultata simulacije. Siva iscrtkana vertikalna linija označuje vremenski trenutak $t = 0.62$ min. Parametri korišteni u slikama su dani u tablicama I i II, osim $N_{CE0} = 0$.

5.2 Usporedba analitičkih rezultata i simulacija

Na slici 5.1 prikazana je usporedba rezultata pristupa srednjeg polja i simulacija. Simulacije su provedene s odabranim vremenskim korakom $\Delta t = 0.1$. Vjerojatnost prikvačivanja je izračunata kao

$$p_{on} = \left(1 - \exp\left(-\frac{v_g n_r p_{att}}{N_0} \Delta t \right) \right) \quad (5.5)$$

od čega je udio polnih kinetohornih mikrotubula dan omjerom $n_{pr}|_{l=L/2-x_{kc}}/n_r$ (usp. Jednadžbu (E.7)). Vjerojatnost otkvačivanja dana je kao

$$p_{off} = (1 - \exp(-k_{off} \Delta t)) . \quad (5.6)$$

Analitički rezultati korišteni u ovom odjeljku uzimaju u obzir vremensku promjenu broja kinetohornih mikrotubula kako je pokazano u dodatku E. Radi proučavanja utjecaja varijabilnosti uzrokovane procesima prikvačivanja i otkvačivanja mikrotubula na kinetohore, broj kinetohornih motornih proteina postavljen je na nulu. U ovom modelu njihov bi utjecaj na brzinu kinetohora bio trenutačan, jer raspodjele nekinetohornih mikrotubula, kao i fizika prikvačivanja motornih proteina na mikrotubule nisu simulirane u ovom radu.

Budući da je broj vezivnih mesta na kinetohorama ograničen na 15 vezivnih mesta [109], a s druge strane analitički pristup iz ovog rada ne mora dati cijelobrojna rješenja, zanimljivo je prikazati usporedbu ta dva pristupa. U slici 5.1(a) vidi se odlično slaganje srednje vrijednosti brojeva mikrotubula na kinetohorama dobivene iz simulacija s krivuljama koje su dobivene koristeći vremenski ovisne jednadžbe za lijeve i desne kinetohorne mikrotubule iz Dodatka E. Siva područja prikazuju standardnu devijaciju u broju mikrotubula za svaki vremenski interval simulacija. Tako na primjer u vremenskom intervalu od 3 min i 54 sekunde do 4 minute broj desnih mikrotubula je dan kao $N_{\text{kr}} = 3.4 \pm 1.5$, a lijevih $N_{\text{kl}} = 11 \pm 1.6$.

Zbog varijacija u broju prikvačenih mikrotubula na kinetohorama može se očekivati da će kretanje kinetohora pokazivati varijabilnost (Slika 5.1(b)). Važno je naglasiti da je crvena linija, koja označuje analitička rješenja, pomaknuta duž x-osi udesno da bi bolje odgovarala simulacijama. Taj pomak označava vremenski odmak od $t = 0.62$ min, odnosno $t = 37.2$ sekundi. U tom trenutku srednji broj mikrotubula na desnoj kinetohori prelazi jedan, što je izračunato inverzijom jednadžbe (E.1):

$$t = -\frac{\ln [1 - N_{\text{kr}}(t)/N_{\text{kr}}]}{(k_{\text{off}} + v_g n_{\text{r}} p_{\text{att}}/N_0)}. \quad (5.7)$$

U tom odmaku vidi se razlika u rezultatima diskretnih simulacija i kontinuiranih rješenja dobivenih pristupom srednjeg polja, jer brzina kinetohora vrlo brzo poprima stalnu vrijednost u pristupu srednjeg polja, dok to nije slučaj u diskretnim simulacijama (slika 5.1(c)). Simulacija pokazuje da prije trenutka $t = 0.62$ min kinetohore u prosjeku imaju negativnu brzinu, što znači da ih sila pasivnih povezujućih proteina tada ima prevladavajući utjecaj. Ako se pogleda kretanje kromosoma u stanicama, može se vidjeti da često postoji određeno vrijeme kretanja obrnuto od smjera centra diobenog vretena ili vrijeme čekanja u blizini pola [4, 55]. Ovo razmatranje također postavlja granice primjenjivosti analitičkog modela. Konkretno, model gubi točnost kada je srednji broj mikrotubula na kinetohori manji od jedan, jer diskretni učinci tada imaju značajan utjecaj.

6. Zaključak i diskusija

U ovom doktorskom radu predstavljen je model kongresije kromosoma koji se temelji na silama ovisnim o duljini preklopa mikrotubula. Pokazano je da motorni proteini u antiparalelnim preklopima stvaraju sile koje prenose kromosome prema središnjoj ravnini vretena. Istodobno, pasivni povezujući proteini u paralelnim preklopima generiraju sile koje mogu ometati kongresiju kromosoma, ovisno o izboru parametara. Ključno je da za izbor parametara koji odgovaraju ljudskim vretenima, kromosome uspješno prilaze središtu vretena brzinom koja se podudara s mjeranjima. Dodatno, izračuni su pokazali da se pod određenim uvjetima kromosome mogu zadržavati na stabilnim pozicijama blizu polova, uz stabilnu poziciju u središtu, što objašnjava nastanak nepravilnih vretena s polarnim kromosome. Nadalje, pokazano je da kinetohorni motorni proteini usmjereni prema plus kraju pomažu kongresiji, povećavajući raspon parametara za koji je kongresija kromosome uspješna. Ovaj model pruža prikladan alat za proučavanje sila relevantnih za kongresiju kromosome i reproducira eksperimentalno izmjerene brzine kinetohora, kao i trajanje kongresije kromosome. Rezultati jednostavnih simulacija prikvačivanja i otkvačivanja mikrotubula za kinetohore pokazuju da je moguće očekivati period čekanja na uspostavu veze između kinetohora i mikrotubula s daljem polu. Vrijeme čekanja je također opaženo u eksperimentalnim mjeranjima.

Pokazalo se da je regulacija duljine mikrotubula vezanih za kinetohore ključna za optimalnu brzinu kongresije [63, 117, 118]. U literaturi je predloženo da je, kako regulacija duljina, tako i sama uspješnost centriranja vezana za upravljanje dinamike mikrotubula od strane motornog proteina Kif18A, koji se nakuplja ovisno o duljini. Dulji mikrotubuli s više Kif18A sporije rastu i opiru se dalnjem pomicanju, povećavajući sile prema daljem polu, kako je prikazano u slici 7 iz Ref. [42]. Naš model pruža alternativno objašnjenje za važnost regulacije duljine mikrotubula koje pruža protein Kif18A. Gibanje kinetohora u modelu predstavljenom u ovom radu je sporije u slučaju vrlo dugačkih mikrotubula zbog manje relativne razlike između broja motora na kinetohornim mikrotubulima na obje kinetohore, kao što se vidi u slici 4.10. Međutim, ova dva mehanizma se ne suprotstav-

ljaju jedan drugome, nego mogu djelovati zajedno, a budući eksperimenti mogu razjasniti doprinos svakog pojedinačnog mehanizma.

Ovaj model opisuje kretanje jednog kromosoma, što podrazumijeva da se kromosomi kreću neovisno jedan o drugome. Proučavanje kretanja kromosoma tijekom metafaze pokazuje da se kromosomi tipično kreću neovisno jedan o drugome, ali u slučaju susjednih kromosoma postoji određena korelacija u njihovom kretanju [120]. Na temelju ovog zapažanja predloženo je da je korelacija posljedica interakcije između kinetohornih mikrotubula susjednih kromosoma. U mehanizmu iz modela predstavljenog u ovom radu, sile na kinetohornim mikrotubulima nastaju iz interakcija sa susjednim mikrotubulima. Stoga bi proširenje modela koje bi uključivalo više kromosoma i interakciju između njihovih kinetohornih mikrotubula moglo rezultirati koreliranim kretanjem susjednih kromosoma. Buduća istraživanja, teoretska i eksperimentalna, otkrit će u kojoj mjeri je kretanje kromosoma korelirano tijekom kongresije.

Tijekom mitoze mikrotubuli s jedne strane mogu se vezati za bilo koju kinetohoru i povremeno tvoriti pogrešne, merotelične ili sintelične veze [121, 122]. Ove vrste pogrešaka tipične su u tumorskim stanicama, pa bi bilo zanimljivo istražiti formiranje i ispravljanje takvih veza pomoću teoretskog modela. Model i simulacije iz ovog rada mogao bi se generalizirati opisivanjem vezanja mikrotubula za kinetohore s obje strane, kao i opaženim odvajanjem mikrotubula od kinetohora ovisnim o napetosti [47, 123] i aktivnosti Aurora B [124–126]. Takav model mogao bi pružiti dublje razumijevanje ispravljanja različitih vrsta pogrešnih veza.

Model predstavljen u ovom radu opisuje kongresiju kromosoma, ali okvir koji je predložen može se proširiti i na metafazu. Prvi od načina proširenja modela bi mogao biti prilagodbom stope odvajanja mikrotubula s kinetohora kao što je izmjereno u eksperimentima [110]. Takvo proširenje modela, te uz pomoć simulacija može pružiti uvid u sile centriranja koje upravlja oscilacijama kinetohora. U postojećim modelima, sila centriranja obično se pripisuje polarnoj sili izbacivanja [98, 100, 101]. Buduća istraživanja pomoći će odrediti koja sila centriranja igra dominantnu ulogu u pokretanju oscilacija kinetohora.

Opis raspodjele mikrotubula pristupom srednjeg polja, kao što je prikazan u ovom radu, može se uz prilagodbu koristiti za proučavanje sustava s više mikrotubula, što je zajednička značajka različitih staničnih procesa. Model se može generalizirati za proučavanje multipolarnih diobenih vretena, koja se pojavljuju u tumorima, uzimajući u obzir mikrotubule koji se protežu prema različitim polovima, što dovodi do pozicioniranja kromosoma na više ekvatorijalnih ploča. Za pregled poznatih mehanizama klasteriranja centrosoma,

koji predstavljaju važan aspekt u formiranju multipolarnih vretena vidi Ref. [127]. Drugi primjer u kojem se može koristiti proširenje prikazanog modela za raspodjele mikrotubula su neuroni. U neuronima su dinamička svojstva mikrotubula ključna za funkciju, oblik i razvoj, te bi proširenje ovog modela moglo pružiti uvid u to kako dinamičko ponašanje mikrotubula doprinosi procesima poput rasta i povlačenja neurita [128].

Zaključno, u ovom radu je predstavljen model koji opisuje najvažnije sile koje se pojavljuju tijekom kongresije kromosoma, i stoga predstavlja moćan alat za proučavanje ovog biološkog procesa. Ovaj model oslanja se na tok mikrotubula prema polu ovisan o duljini preklopa i opisuje distribucije mikrotubula u aproksimaciji srednjeg polja, što omogućuje sustavno istraživanje prostora parametara i razlikovanje doprinosa različitih mehanizama. Usporedbe sa simulacijama pokazuju uredno slaganje glavnih rezultata, te otvara mogućnosti daljnog istraživanja slučajeva u kojima pristup srednjeg polja pokazuje ograničenja.

Dodaci

A Zanemarivanje inercijskog člana u gibanju kromosoma

Jednadžba kretanja kromosoma unutar stanice odgovara Newtonovoj jednadžbi kretanja za objekt u gušenom mediju, gdje je otpor proporcionalan brzini, pod utjecajem stalne sile F :

$$m \frac{dv}{dt} + \eta v = F \quad (\text{A.1})$$

gdje je m masa tijela, v brzina tijela, a η stopa otpora. Ako tijelo kreće iz mirovanja, rješenje jednadžbe (A.1) je:

$$v = \frac{F}{\eta} \left(1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau} \right) \right), \quad (\text{A.2})$$

gdje je $\tau = \frac{m}{\eta}$ srednje vrijeme potrebno za dostizanje terminalne brzine $\frac{F}{\eta}$. Za kromosome to vrijeme je $\tau = 1.2 \times 10^{-10}$ s, što je izračunato koristeći $\eta = 0.08$, pN min / μm [111] i $m = 0.6$ pg [129]. To vrijeme je zanemarivo u kontekstu kretanja kromosoma unutar stanica gdje su brzine kromosoma oko $3 \mu\text{m}/\text{min}$ [130], a vrijeme kongresije obično 5-10 min [55, 113]. Iz tih razloga se inercijalni član može zanemariti te se jednadžba kretanja svede na:

$$\eta v = F \quad (\text{A.3})$$

B Jednadžbe modela za lijevu i desnu stranu diobenog vretena

Kako bi se mogla izračunati brzina kinetohora kao posljedica djelovanja sila na lijevu i desnu kinetohoru, potrebno je dati daljnje definicije funkcija. Tako brzine rasta kineto-

hornih mikrotubula za obje strane su definirane kaorazlika brzina kinetohora i brzine toka pripadajućih kinetohornih mikrotubula

$$v_{\text{gkr},\ell} \equiv \pm(v_{\text{kfr},\ell} - v_{\text{kc}}). \quad (\text{B.1})$$

Pod djelovanjem sila kinetohorni mikrotubuli rastu:

$$v_{\text{gkr},\ell} = \frac{\pm 1}{\xi_{\text{gk}}} (M_{\text{mr},\ell} f_{\text{mr},\ell} + M_{\text{cr},\ell} f_{\text{cr},\ell}). \quad (\text{B.2})$$

Ovdje i u ovim dodacima gornji predznak ("+" ili "-") odgovara desnom indeksu "r", a donji predznak odgovara lijevom indeksu "\ell". Prosječna sila po motornom proteinu $f_{\text{mr},\ell}$ za obje strane računa se kao

$$f_{\text{mr},\ell} = f_0(\pm 1 - \frac{v_{\text{kfr},\ell} - v_{\text{fr},\ell}}{v_0}). \quad (\text{B.3})$$

Slično tome, prosječna sila otpora po pasivnom povezujućem proteinu se računa se kao

$$f_{\text{cr},\ell} = -\xi_{\text{c}}(v_{\text{kfr},\ell} - v_{\text{fr},\ell}). \quad (\text{B.4})$$

Dodatno, sile zbog kinetohornih motornih proteina koji koračaju udesno ili ulijevo računaju se kao

$$f_{\text{CEr},\ell} = f_{\text{CEO}} \left(\pm 1 - \frac{v_{\text{kc}} - v_{\text{f}\ell,\text{r}}}{v_{\text{CEO}}} \right). \quad (\text{B.5})$$

Jednadžbe koje upravljaju raspodjelama nekinetohornih mikrotubula za lijevu i desnu stranu identične su onima u jed. (2.22) - (2.25) po obliku. Međutim, u jed.(2.24), broj mikrotubula polova na položaju x usmjerenih ulijevo, $N_{\text{pr}}(x)$, povezan je s brojem polnih mikrotubula na položaju x usmjerenih udesno kao $N_{\text{p}\ell}(x) = N_{\text{pr}}(-x)$.

Jednadžbe za raspodjele kinetohornih mikrotubula na lijevom i desnom kinetohoru razlikuju se u jednom članu zbog brzine kinetohora koja utječe na vezanje:

$$\begin{aligned} \frac{dN_{\text{kpr},\ell}}{dt} &= (v_g \pm v_{\text{kc}}) p_{\text{att}} (1 - \frac{N_{\text{kpr},\ell}}{N_0}) n_{\text{p}}|_{l=L/2 \mp x_{\text{kc}}} \\ &\quad - k_{\text{off}} N_{\text{kpr},\ell}, \end{aligned} \quad (\text{B.6})$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial n_{\text{knr},\ell}}{\partial t} &= (v_g \pm v_{\text{kc}}) p_{\text{att}} (1 - \frac{N_{\text{kpr},\ell}}{N_0}) \rho_{\text{nr},\ell}|_{x=x_{\text{kc}} \pm l} \\ &\quad - k_{\text{off}} n_{\text{knr},\ell}. \end{aligned} \quad (\text{B.7})$$

Broj kinetohornih mikrotubula na desnoj i lijevoj kinetohori računa se kao:

$$N_{\text{kr},\ell} = N_{\text{kpr},\ell} + \int_0^{L/2 \mp x_{\text{kc}}} n_{\text{knr},\ell} dl \quad (\text{B.8})$$

a prosječne duljine paralelnih i antiparalelnih preklopa kao:

$$\begin{aligned} L_{\text{apr,ppr}} &= \frac{1}{N_{\text{kr}}} \left(N_{\text{kpr}} \int_{x_{\text{kc}}}^{L/2} dx P_{\ell,\text{r}} \right. \\ &\quad \left. + \int_0^{L/2 - x_{\text{kc}}} dl n_{\text{kpr}} \int_{x_{\text{kc}}}^{x_{\text{kc}}+l} dx P_{\ell,\text{r}} \right), \end{aligned} \quad (\text{B.9})$$

$$\begin{aligned} L_{\text{ap}\ell,\text{pp}\ell} &= \frac{1}{N_{\text{k}\ell}} \left(N_{\text{k}\ell} \int_{x_{\text{kc}}}^{L/2} dx P_{\text{r},\ell} \right. \\ &\quad \left. + \int_0^{L/2 + x_{\text{kc}}} dl n_{\text{k}\ell} \int_{x_{\text{kc}}-l}^{x_{\text{kc}}} dx P_{\text{r},\ell} \right). \end{aligned} \quad (\text{B.10})$$

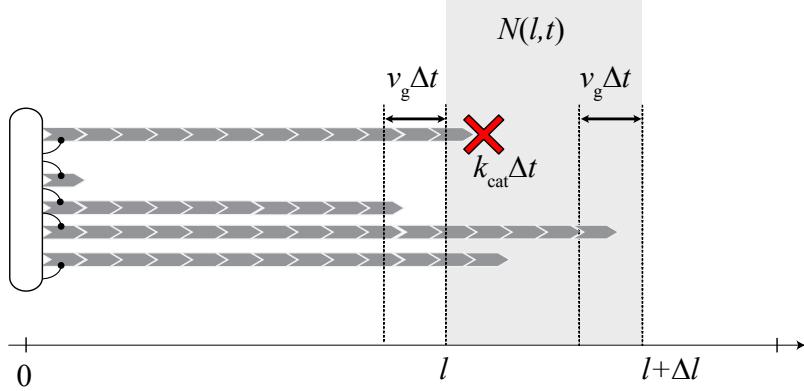
Ovdje su predstavljene jednadžbe za lijevu i desnu stranu koje odgovaraju jednadžbama (2.3) - (2.31)

C Prijelaz iz diskretnih raspodjela u kontinuirane raspodjele mikrotubula

U ovom dodatku je prikazan prijelaz iz opisa distribucija diskretnih mikrotubula u opis koji koristi aproksimaciju srednjeg polja za jednostavniji primjer populacije mikrotubula koje rastu samo s pola. Za rastuće mikrotubule ovdje se prepostavlja da se nakon katastrofe potpuno depolimeriziraju. Slika 1 prikazuje shematski prikaz promjene broja mikrotubula opisane u ovom poglavlju. Broj rastućih mikrotubula s duljinom iz intervala $[l, l + \Delta l]$ dan je kao $N(t)|_{[l, l + \Delta l]}$. U trenutku $t + \Delta t$ imamo:

$$\begin{aligned} N(t + \Delta t)|_{[l, l + \Delta l]} &= N(t)|_{[l, l + \Delta l]} - (1 - \exp(-k_{\text{cat}}\Delta t)) N(t)|_{[l, l + \Delta l]} \\ &\quad + N(t)|_{[l - v_{\text{g}}\Delta t, l]} - N(t)|_{[l + \Delta t - v_{\text{g}}\Delta t, l + \Delta l]}. \end{aligned} \quad (\text{C.1})$$

Ta jednadžba opisuje kako je broj mikrotubula duljine iz intervala $(l, l + \Delta l)$ u trenutku $t + \Delta t$ dan kao broj mikrotubula u trenutku t umanjanjen za broj mikrotubula koji su otišli u katastrofu, a $(1 - \exp(-k_{\text{cat}}\Delta t))$ je vjerojatnost odlaska jednog mikrotubula u katastrofu, a k_{cat} je stopa ulaska u katastrofu. Sljedeći član govori da je broj mikrotubula



Slika 1: Shematski prikaz promjene broja mikrotubula $N(l, t)$ u intervalu duljine $(l, l + \Delta l)$ tijekom vremena Δt . Mikrotubuli rastu brzinom v_g , tako da mikrotubuli s duljinom iz intervala $(l - v_g \Delta t, l)$ ulaze u promatrani interval, dok mikrotubuli s duljinom iz intervala $(l + \Delta l - v_g \Delta t, l + \Delta l)$ izlaze iz njega. Dodatno, mikrotubuli mogu ući u katastrofu sa stopom k_{cat} , smanjujući njihov broj u promatranom intervalu.

uvećan za broj mikrotubula koji su u vremenu Δt narasli do duljine u intervalu $(l, l + \Delta l)$. Brzina rasta mikrotubula je označena s v_g . Slično, oduzima se onaj broj mikrotubula čija je duljina u vremenu Δt prelazi duljinu $l + \Delta l$. Za duljinu $l = 0$ ta jednadžba uključuje nukleaciju mikrotubula na polu sa stopom nukleacije k_p :

$$N(t + \Delta t)|_{[0, \Delta l]} = N(t)|_{[0, \Delta l]} + k_p \Delta t - (1 - \exp(-k_{\text{cat}} \Delta t)) N(t)|_{[0, \Delta l]} - N(t)|_{[\Delta l - v_g \Delta t, \Delta l]}. \quad (\text{C.2})$$

Kako bi se prešlo u opis distribucije mikrotubula u aproksimaciji srednjeg polja, smanjuje se vremenski i duljinski korak, $\Delta t \rightarrow dt$ i $\Delta l \rightarrow dl$. Nadalje, potrebno je prepostaviti da se u malim duljinskim intervalima brojevi mikrotubula mogu opisati funkcijom gustoće $n(t, l)$ za koju vrijedi:

$$N(t)|_{[l, l+dl]} = dl n(t, l) \quad (\text{C.3})$$

Sada se za jednadžbu (C.1) dobiva:

$$dl [n(l, t + dt) - n(l, t)] = -k_{\text{cat}} dt dl n(l, t) - v_g dt [n(l + dl, t) - n(l, t)]. \quad (\text{C.4})$$

iz toga slijedi:

$$\frac{\partial n(l, t)}{\partial t} = -k_{\text{cat}} n(l, t) - v_g \frac{\partial n(l, t)}{\partial l}, \quad (\text{C.5})$$

A za duljinu $l = 0$ slijedi:

$$dl [n(0, t + dt) - n(0, t)] = k_p dt - k_{\text{cat}} dt N(0, t) - v_g dt dl [n(dl, t) - n(0^-, t)] \quad (\text{C.6})$$

gdje je iskorišteno $n(dl, t) = n(dl, t) - n(0^-, t)$, jer $n(0^-, t) = 0$. Slijedi:

$$\frac{\partial n(0, t)}{\partial t} = k_p \frac{1}{dl} - k_{\text{cat}} n(0, t) - v_g \frac{\partial n(0, t)}{\partial l}, \quad (\text{C.7})$$

Prvi član s desne strane jednadžbe, $k_p \frac{1}{dl}$ ima oblik koji podsjeća na definiciju Diracove delta funkcije u limesu kada $dl \rightarrow 0$. Kako bi to bilo jasnije, potrebno je razmotriti sljedeće:

1. Diracova delta funkcija $\delta(x)$ je definirana tako da je jednaka nuli svugdje osim u $x = 0$, a integral koji uključuje nulu je jednak 1:

$$\int_{-\epsilon}^{\epsilon} \delta(x) dx = 1. \quad (\text{C.8})$$

2. U slučaju iz jednadžbe (C.7), $k_p \frac{1}{dl}$ predstavlja koncentraciju novih mikrotubula koji se stvaraju na duljini $l = 0$. Kada $dl \rightarrow 0$, ova vrijednost teži beskonačnosti, ali samo na tom jednom mjestu, a integral ovog člana preko malog intervala oko $l = 0$ daje konačnu vrijednost:

$$\int_{0^-}^{\epsilon} k_p \frac{1}{dl} dl = k_p, \quad (\text{C.9})$$

gdje je ϵ mala pozitivna vrijednost.

Stoga, u limesu kada $dl \rightarrow 0$, član $k_p \frac{1}{dl}$ poprima karakteristike Diracove delta funkcije pomnožene s k_p :

$$\lim_{dl \rightarrow 0} k_p \frac{1}{dl} = k_p \delta(l), \quad (\text{C.10})$$

gdje $\delta(l)$ predstavlja Diracovu delta funkciju.

Iz tih razmatranja slijedi jednadžba raspodjele mikrotubula koji rastu na polu, te se nakon katastrofe potpuno depolimeriziraju:

$$\frac{\partial n(l, t)}{\partial t} = k_p \delta(l) - k_{\text{cat}} n(l, t) - v_g \frac{\partial n(l, t)}{\partial l}, \quad (\text{C.11})$$

D Izračun vremenske promjene raspodjele nekinetohor- nih mikrotubula s pola

Jednadžbe (2.22)-(2.25) moguće je riješiti egzaktno, no ovdje će biti pokazano rješenje samo za jed. (2.22), budući da je dovoljna za razumjeti vremensku skalu potrebnu za ulazak ovog sustava u ravnotežu. Za korištenje Laplaceove transformacije rješava se sljedeća jednadžba:

$$\frac{\partial n_p}{\partial t} = k_p \delta(l) - k_{ps} n_p - \frac{\partial v_g n_p}{\partial l} \quad (\text{D.1})$$

Primjenjuje se Laplaceova transformacija s obzirom na l na obje strane jendakosti, pri čemu se transformacijska varijabla označava kao s :

$$\mathcal{L} \left\{ \frac{\partial n_p}{\partial t} \right\} = \mathcal{L} \left\{ k_p \delta(l) - k_{ps} n_p - \frac{\partial v_g n_p}{\partial l} \right\}. \quad (\text{D.2})$$

Korištenjem svojstava Laplaceove transformacije dobiva se:

$$\frac{dN_p}{dt} + v_g s N_p - v_g n_p(t, 0) = k_p \exp(-\epsilon s) - k_{ps} N_p \quad (\text{D.3})$$

gdje je $N(s, l)$ Laplaceova transformacija od $n_p(t, l)$ s obzirom na l , i gdje je iskorišteno da je rubni uvjet pomaknut $n_p(t, 0) = 0$. Preuređivanjem dobiva se:

$$\frac{dN_p}{dt} = k_p - (k_{ps} + v_g s) N_p, \quad (\text{D.4})$$

što je linearna diferencijalna jednadžba prvog reda u t , a čije rješenje, uz početni uvjet $N_p(0, l) = 0$ glasi:

$$N_p = \frac{k_p}{k_{ps} + v_g s} (1 - e^{-(k_{ps} + v_g s)t}) \quad (\text{D.5})$$

Za povratak u prostornu domenu, potrebno je primijeniti inverznu Laplaceovu transformaciju:

$$n_p(t, l) = \frac{k_p}{v_g} \exp\left(-\frac{k_{ps}}{v_g} l\right) (1 - \theta(l - v_g t)), \quad (\text{D.6})$$

gdje je θ jedinična step funkcija koja je nula za vrijednosti argumenta manje od nula, a jedan inače, osiguravajući da je gustoća mikrotubula nula za $l > v_g t$. Taj rezultat je jednostavno razumjeti, jer govori da nema mikrotubula na pozicijama koje su udaljenije od dokle su mikrotubuli koji rastu brzinom v_g mogli stići. Sistem dolazi u ravnotežno stanje nakon otprilike $l_0/v_g = 0.07$ min što je potpuno zanemarivo u odnosu na vrijeme

potrebno za kongresiju.

E Vremenska promjena broja mikrotubula na kinetohorama

Vremensku promjenu ukupnog broja mikrotubula pričvršćenih na desnoj kinetohori računa se promatrajući zbroj $N_{\text{kr}} = N_{\text{kpr}} + \int_0^{L/2-x_{\text{kc}}} n_{\text{knr}} dl$, te slijedi iz jednadžbi (2.27) i (2.28):

$$\frac{dN_{\text{kr}}}{dt} = v_g n_r p_{\text{att}} \left(1 - \frac{N_{\text{kr}}}{N_0}\right) - k_{\text{off}} N_{\text{kr}}, \quad (\text{E.1})$$

gdje je korištena pokrata

$$n_r = \left[n_{\text{pr}} \Big|_{l=L/2-x_{\text{kc}}} + \int_0^{L/2-x_{\text{kc}}} \rho_{\text{nr}} \Big|_{x=l+x_{\text{kc}}} dl \right] \quad (\text{E.2})$$

$$= \frac{k_p}{v_g} \exp\left(-\frac{1}{l_0}(L/2 - x_{\text{kc}})\right) \\ + \frac{k_n c}{v_g} \left(\frac{k_p}{k_{\text{ps}}} + \frac{k_p}{k_{\text{cat}}}\right) (L/2 - x_{\text{kc}}) \exp\left(-\frac{1}{l_0}(L/2 - x_{\text{kc}})\right). \quad (\text{E.3})$$

U jednadžbi (E.1) je zanemarena brzina kinetohora jer je puno manja od brzine rasta mikrotubula, a uvodi nelinearnost u računu, jer ovisi o broju mikrotubula. Osim toga, koriste se ravnotežne raspodjele nekinetohornih mikrotubula jer je za svaku poziciju x vrijeme potrebno da okolni mikrotubuli uđu u stanje ravnoteže manje od $L/v_g = 0.42$ min, što je mnogo manje od vremena potrebno za kongresiju. Budući da n_r ne ovisi o vremenu, uz početni uvjet $N_{\text{kr}}(t=0) = 0$ slijedi rješenje:

$$N_{\text{kr}}(t) = N_0 \frac{v_g p_{\text{att}} n_r}{N_0 k_{\text{off}} + v_g n_r p_{\text{att}}} [1 - \exp(-(k_{\text{off}} + v_g n_r p_{\text{att}}/N_0) t)]. \quad (\text{E.4})$$

Iz te jednadžbe se vidi da je vrijeme potrebno da broj mikrotubula na kinetohorama na poziciji $x_{\text{kc}} = 0$ dođe u ravnotežu je otprilike 2.8 min, što je kraće od vremena potrebno za kongresiju.

Kako bi se pronašla vremenska riješenja jednadžbi (2.27) i (2.28) može se koristiti

integracijski faktor $\mu(t) = \exp(k_{\text{off}}t)$, čime slijedi:

$$\frac{d\mu(t)N_{\text{kpr}}}{dt} = k_1\mu(t) \left(1 - \frac{N_{\text{kr}}}{N_0}\right), \quad (\text{E.5})$$

$$\frac{d\mu(t)n_{\text{knr}}}{dt} = k_2\mu(t) \left(1 - \frac{N_{\text{kr}}}{N_0}\right), \quad (\text{E.6})$$

gdje je korištena pokrata $k_1 = v_g n_{\text{pr}}|_{l=L/2-x_{\text{kc}}} p_{\text{att}}$ i $k_2 = v_g \rho_{\text{nr}}|_{x=l+x_{\text{kc}}} p_{\text{att}}$. Ako se isti integracijski faktor iskoristi u jednadžbi (E.1) može se vidjeti da slijedi:

$$N_{\text{kpr}} = \frac{n_{\text{pr}}|_{l=L/2-x_{\text{kc}}}}{n_r} N_{\text{kr}} \quad (\text{E.7})$$

$$n_{\text{knr}} = \frac{\rho_{\text{nr}}|_{x=l+x_{\text{kc}}}}{n_r} N_{\text{kr}} \quad (\text{E.8})$$

Što znači da sve tri funkcije imaju istu vremensku ovisnost. Brojevi kinetohornih mikrotubula s lijeve strane dobiju se substitucijama $x \rightarrow -x$ i $x_{\text{kc}} \rightarrow -x_{\text{kc}}$.

F Proširenje modela raspodjela mikrotubula s obzirom na minus krajeve

U realnim stanicama mikrotubuli koji se nukleiraju na polu pokazuju da raspodjele minus krajeva blizu polova raširene blizu polova poprimaju maksimumalnu vrijednost u položaju udaljenim za otprilike $1 \mu\text{m}$ od pola. U ovom poglavlju se prikazuje moguće proširenje modela koji bi reproduciralo takvo ponašanje, bez uloženja u detalje oko depolimerizacije mikrotubula na minus krajevima u blizini polova. Najjednostavnije proširenje jednadžbe (2.22) dobiva se množenjem nukleacijskog člana jednadžbe (2.22) s funkcijom koja ovisi o x Gaussovom raspodjelom:

$$\frac{\partial \rho_{\text{p}\ell}(x, l)}{\partial t} = k_{\text{p}}\delta(l)c_{\text{p}}(x) - k_{\text{ps}}n_{\text{pr}} - v_g \frac{\partial n_{\text{pr}}}{\partial l}, \quad (\text{F.1})$$

gdje je $c_{\text{p}}(x)$ gustoća nukleacijskih mesta na polu:

$$c_{\text{p}}(x) = A \theta(L/2 - x) \exp(-(x + (L/2 - a))^2/s^2). \quad (\text{F.2})$$

U toj jednadžbi $A = 1/\int_0^L \exp(-(x - a)^2/2s^2)$ je normalizacijski faktor. Vrh raspodjele minus krajeva s lijeve strane je udaljen za udaljenost a od lijevog pola, dok s predstavlja

širinu raspodjele, a $\theta(L/2 - x)$ osigurava da $\rho_{p\ell}(x, l) = 0$ za $x < L/2$. Takva jednadžba i pripadajuća raspodjela pauzirajućih mikrotubula u stacionarnom obliku imaju oblik:

$$\rho_{p\ell} = c_p(x) \frac{k_p}{v_g} \exp\left(-\frac{1}{l_0}l\right), \quad (\text{F.3})$$

$$\tilde{\rho}_{p\ell} = \frac{k_{ps}}{k_{cat}} n_{p\ell} \quad (\text{F.4})$$

Ukupni broj polnih mikrotubula u poziciji x dan je kao broj mikrotubula kojima je minus kraj (x') lijevo od x , a plus kraj $x'' = l + x'$ desno od x :

$$\begin{aligned} N_{p\ell}(x) &= \int_{-L/2}^x dx' \int_x^\infty dx'' \rho_{p\ell}(x', l = x'' - x') + \tilde{\rho}_{p\ell}(x', l = x'' - x') \\ &= k_p \left[\frac{1}{k_{ps}} + \frac{1}{k_{cat}} \right] \exp\left(-\frac{1}{l_0}x\right) \int_{-L/2}^x dx' c_p(x') \exp\left(\frac{1}{l_0}x'\right) \end{aligned} \quad (\text{F.5})$$

Integral u toj jednadžbi nije rješiv analitički zbog funkcije $c_p(x)$, te ju je potrebno numerički računati. Međutim, i bez eksplisitnog računanja $N_{p\ell}(x)$ ipak je moguće doći do oblika stacionarnih rješenja za mikrotubule koji rastu duž drugih mikrotubula:

$$\rho_{n\ell} = \frac{k_n c}{v_g} N_{p\ell}(x) \exp\left(-\frac{1}{l_0}l\right) \quad (\text{F.6})$$

$$\tilde{\rho}_{n\ell} = \frac{k_{ps}}{k_{cat}} \rho_{n\ell}. \quad (\text{F.7})$$

Raspodjela gustoće minus krajeva sada slijedi kao:

$$n_-(x) = c_p(x) k_p \left[\frac{1}{k_{ps}} + \frac{1}{k_{cat}} \right] \quad (\text{F.8})$$

$$+ k_n c k_p \left[\frac{1}{k_{ps}} + \frac{1}{k_{cat}} \right]^2 \exp\left(-\frac{1}{l_0}x\right) \int_{-L/2}^x dx' c_p(x') \exp\left(\frac{1}{l_0}x'\right). \quad (\text{F.9})$$

zbog istih dimenzija raspodjela rastućih mikrotubula $\rho_{p\ell}$ i $\rho_{n\ell}$ može ih se označiti zajedničkim simbolom $\rho_\ell = \rho_{p\ell} + \rho_{n\ell}$. Pripadajuća raspodjela rastućih plus krajeva računa

se kao:

$$\begin{aligned}
n_+(x) &= \int_{-L/2}^x dx' \rho_{p\ell}(x', l = x'' - x') + \rho_{n\ell}(x', l = x'' - x') \\
&= \frac{k_p}{v_g} \exp\left(-\frac{1}{l_0}x\right) \int_{-L/2}^x dx' c_p(x') \exp\left(\frac{1}{l_0}x'\right) \\
&\quad + \frac{k_n c}{v_g} \exp\left(-\frac{1}{l_0}x\right) \int_{-L/2}^x dx' N_{p\ell}(x') \exp\left(\frac{1}{l_0}x'\right)
\end{aligned} \tag{F.10}$$

U slici 4.2(a) može se izmjeriti da je vrh raspodjele udaljen za $0.7 \text{ }\mu\text{m}$ od pola, s polovicom širine $0.7 \text{ }\mu\text{m}$. Koristeći skaliranje s obzirom na veće diobeno vreteno, kao u što je objašnjeno u Tablici I u fusnoti a, to odgovara parametrima $a = 0.9 \text{ }\mu\text{m}$, $s = 0.8 \text{ }\mu\text{m}$, s tim da za parametar s vrijedi $s = \text{HWHM} \cdot \sqrt{\ln(2)}$.

Ukupni broj mikrotubula $N_\ell(x)$ u položaju x je se računa kao integral plus krajeva desno od x , te minus krajeva od $-L/2$ do x :

$$\begin{aligned}
N_\ell(x) &= \int_{-L/2}^x dx' \int_x^\infty dx'' \rho_{p\ell}(x', l = x'' - x') + \rho_{n\ell}(x', l = x'' - x') \\
&= \frac{k_p}{k_{ps}} \exp\left(-\frac{1}{l_0}x\right) \int_{-L/2}^x dx' c_p(x') \exp\left(\frac{1}{l_0}x'\right) \\
&\quad + \frac{k_n c}{k_{ps}} \exp\left(-\frac{1}{l_0}x\right) \int_{-L/2}^x dx' N_{p\ell}(x') \exp\left(\frac{1}{l_0}x'\right)
\end{aligned} \tag{F.11}$$

Broj kinetohornih mikrotubula i raspodjela ovisna o minus krajevima može se izračunati kao

$$N_{k\ell} = \frac{\frac{v_g}{k_{off}} p_{att} n_+(x_{kc})}{1 + \frac{v_g}{N_0 k_{off}} p_{att} n_+(x_{kc})}, \tag{F.12}$$

$$n_{k\ell}(x) = \frac{v_g}{k_{off}} p_{att} \frac{\rho_\ell(x, l = x_{kc} - x)}{1 + \frac{v_g}{k_{off} N_0} p_{att} n_+(x_{kc})}. \tag{F.13}$$

Koristeći definicije iz jednadžbi (2.15) i (2.16) može se pokazati da duljina antiparalelnih i paralelnih preklopa slijede kao:

$$N_{k\ell} \cdot L_{ap\ell}(x_{kc}) = \int_{-L/2}^{x_{kc}} dx' n_{k\ell}(x') \int_{x'}^{x_{kc}} dx'' P_r(x'') \tag{F.14}$$

$$N_{k\ell} \cdot L_{pp\ell}(x_{kc}) = \int_{-L/2}^{x_{kc}} dx' n_{k\ell}(x') \int_{x'}^{x_{kc}} dx'' P_\ell(x'') \tag{F.15}$$

G Analiza stabilnosti za kinetohore u blizini središnje ravnine vretena

Kako bismo istražili stabilnost pozicioniranja kinetohora oko središta vretena, računamo smjer brzine kinetohora u blizini središta vretena. Iz jed. (3.10) slijedi zrcalna simetrija s obzirom na centar vretena za vjerojatnost vezanja motornih proteina za lijevu i desnu stranu

$$P_l(x) = P_r(-x). \quad (\text{G.1})$$

Zbog ove simetrije, postoji također zrcalna simetrija za brojeve motornih proteina i umreživača za lijevu i desnu stranu

$$M_{\text{cr,mr}}(x) = M_{\text{cl,m}\ell}(-x). \quad (\text{G.2})$$

Koristeći ove simetrije za izračun brzine kinetohora, iz jed. (2.37) slijedi da je brzina antisimetrična s obzirom na centar vretena $v_{\text{kc}}(x) = -v_{\text{kc}}(-x)$, te da je jednaka nuli u središtu vretena.

Točke x_f u kojima je $\frac{dx}{dt} = 0$ nazivamo fiksnim točkama jer objekt koji se nađe u takvoj točki ostaje u njoj. Fiksnu točku se naziva stabilnom ako se objekt izmaknut iz te točke, vrati u nju. Fiksnu točku se naziva nestabilnom ako se objekt izmaknut iz te točke, od nje udaljava.

Računamo brzinu kinetohora u blizini središta vretena, na položaju $x_{\text{kc}} = \epsilon$, koji je malen u usporedbi s tipičnom duljinom mikrotubula $|\epsilon| \ll l_0$. Taylorov razvoj v_{kc} kao funkcije položaja x u točki $x = 0$ do prvog člana daje

$$v_{\text{kc}}(\epsilon) = v'_{\text{kc}}(0)\epsilon. \quad (\text{G.3})$$

Ova jednadžba pruža informacije o stabilnosti pozicioniranja kinetohora. Tako na primjer, ako je $v'_{\text{kc}}(0) < 0$, položaj $x_{\text{kc}} = 0$ je stabilan te odmak od njega rezultira time da se kinetohore vraćaju u $x_{\text{kc}} = 0$.

Ovdje i kroz cijeli tekst, simbol ' označava prvu derivaciju funkcije po x . Uzimajući prvu derivaciju jed. (2.37) u $x = 0$ i koristeći zrcalne simetrije motornih proteina, pasivnih

povezujućih proteina i vjerojatnosti vezanja kinetohornih motornih proteina nalazimo:

$$\begin{aligned} v'_{\text{kc}}(0) &= \frac{v_0}{\gamma_{\text{MT}}} \left(\frac{f_0}{v_0} (M'_{\text{mr}}(0)) + \xi_c (M'_{\text{cr}}(0)) \right) \\ &+ 2 \frac{v_{\text{CE0}} - v_0/2}{\gamma_{\text{CE}}} \frac{f_{\text{CE0}}}{v_{\text{CE0}}} 2N_{\text{CE}} P'_\ell(0). \end{aligned} \quad (\text{G.4})$$

To znači da predznak derivacije funkcija M_{mr} , M_{cr} i P_ℓ u točki $x = 0$ pokazuje, za dani interval oko centra, djeluju li pojedini proteinski mehanizmi vretena u smjeru kongresije kromosoma ili ju ometaju. Dodatno iz te jednadžbe moguće je naći vrijednosti parametara za koje vrijedi $v'_{\text{kc}}(0) = 0$, što bi odgovaralo prijelazu stabilnosti središnje fiksne točke. Na primjer, za slučaj sa samo motornim i pasivnim povezujućim proteinima taj prijelaz se događa kad vrijedi:

$$c_c = - \frac{\frac{f_0}{v_0} (L_{\text{apr}} N_{\text{kr}})'}{\xi_c (L_{\text{ppr}} N_{\text{kr}})'} c_m. \quad (\text{G.5})$$

Bibliografija

- [1] C. Chow, H. F. Lodish, W. D. Stein, M. R. Bernfield, R. A. Laskey, B. M. Alberts, L. A. Staehelin, M. Cuffe, J. M. Slack, i J. A. Cooper, “Cell.” Encyclopedia Britannica, 2024. Pриступлено 16.11.2024.
- [2] R. B. Nicklas i C. A. Staehly, “Chromosome micromanipulation,” *Chromosoma*, sv. 21, br. 1, str. 1–16, 1967.
- [3] R. B. Nicklas, “Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase,” *The Journal of cell biology*, sv. 97, br. 2, str. 542–548, 1983.
- [4] V. Magidson, C. B. O'Connell, J. Lončarek, R. Paul, A. Mogilner, i A. Khodjakov, “The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly,” *Cell*, sv. 146, br. 4, str. 555–567, 2011.
- [5] R. Hooke, J. Allestry, i J. Martyn, *Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon*. London: Printed by Jo. Martyn and Ja. Allestry, printers to the Royal Society, 1665.
- [6] A. Van Leeuwenhoek, “Observations, communicated to the publisher by mr. Anthony van Leeuwenhoeck, in a dutch letter of the 9th Octob. 1676. here English'd: Concerning little animals by him observed in rain-well-sea- and snow water; as also in water wherein pepper had lain infused,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, sv. 12, br. 133, str. 821–831, 1677.
- [7] M. J. Schleiden, “Beiträge zur phytogenesis,” *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*, sv. 5, br. 2, str. 137–176, 1838.
- [8] T. Schwann, *Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen*. Berlin: Verlag der San-

der'schen Buchhandlung (G. E. Reimer), 1839. Available from the Wellcome Library collection.

- [9] W. Flemming, "Beiträge zur kenntniss der zelle und ihrer lebenserscheinungen," *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, sv. 18, str. 302–437, 1880.
- [10] L. Drüner, "Studien über den mechanismus der zelltheilung. jenaische zeitschr. f," *Naturw. Bd*, sv. 29, str. 271 – 345, 1895.
- [11] J. R. McIntosh i T. Hays, "A brief history of research on mitotic mechanisms," *Biology*, sv. 5, br. 4, str. 55, 2016.
- [12] R. Lauterborn, *Untersuchungen über Bau, Kernteilung und Bewegung der Diatomeen*. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1896. Aus dem Zoologischen Institut der Universität Heidelberg. Mit 1 Figur im Text und 10 Tafeln.
- [13] R. Chambers Jr., "Microdissection studies. ii. The cell aster: A reversible gelation phenomenon," *Journal of Experimental Zoology*, sv. 23, br. 3, str. 483–505, 1917.
- [14] C. D. Darlington, *Recent advances in cytology*. Philadelphia, P. Blakiston's son & co., inc, 1937, 1937.
- [15] G. Oestergren, "Equilibrium of trivalents and the mechanism of chromosome movements," *Hereditas*, sv. 31, br. 3-4, str. 498, 1945.
- [16] A. F. Hughes i M. M. Swann, "Anaphase movements in the living cell," *Journal of Experimental Biology*, sv. 25, br. 1, str. 45–72, 1948.
- [17] S. Inoué i K. Dan, "Birefringenoe of the dividing cell," *Journal of Morphology*, sv. 89, br. 3, str. 423–455, 1951.
- [18] G. Rozsa i R. W. Wyckoff, "The electron microscopy of dividing cells," *Biochimica et Biophysica Acta*, sv. 6, str. 334–339, 1950.
- [19] P. Harris, "Some observations concerning metakinesis in sea urchin eggs," *The Journal of Cell Biology*, sv. 25, br. 1, str. 73–77, 1965.
- [20] B. R. Brinkley i E. Stubblefield, "The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro," *Chromosoma*, sv. 19, br. 1, str. 28–43, 1966.

- [21] W. G. Hirst, C. Kiefer, M. K. Abdosamadi, E. Schäffer, i S. Reber, “In vitro reconstitution and imaging of microtubule dynamics by fluorescence and label-free microscopy,” *STAR Protocols*, sv. 1, str. 100177, Dec. 2020.
- [22] N. Pavin i I. M. Tolić, “Self-organization and forces in the mitotic spindle,” *Annual Review of Biophysics*, sv. 45, br. 1, str. 279–298, 2016.
- [23] N. Pavin i I. M. Tolić, “Mechanobiology of the mitotic spindle,” *Developmental Cell*, sv. 56, br. 2, str. 192–201, 2021.
- [24] R. Kiewisz, G. Fabig, W. Conway, D. Baum, D. Needleman, i T. Müller-Reichert, “Three-dimensional structure of kinetochore-fibers in human mitotic spindles,” *eLife*, sv. 11, str. e75459, 2022.
- [25] T. Mitchison i M. Kirschner, “Dynamic instability of microtubule growth,” *Nature*, sv. 312, br. 5991, str. 237–242, 1984.
- [26] S. Petry i R. D. Vale, “Microtubule nucleation at the centrosome and beyond,” *Nature Cell Biology*, sv. 17, br. 9, str. 1089–1093, 2015.
- [27] A. Thawani i S. Petry, “Molecular insight into how γ -TuRC makes microtubules,” *Journal of Cell Science*, sv. 134, br. 14, str. jcs245464, 2021.
- [28] I. Hagan i M. Yanagida, “Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7⁺* gene,” *Nature*, sv. 347, br. 6293, str. 563–566, 1990.
- [29] K. E. Sawin, K. LeGuellec, M. Philippe, i T. J. Mitchison, “Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor.,” *Nature*, sv. 359, br. 6395, str. 540–543, 1992.
- [30] D. Pellman, “Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *saccharomyces cerevisiae*,” *The Journal of Cell Biology*, sv. 130, br. 6, str. 1373–1385, 1995.
- [31] W. Jiang, G. Jimenez, N. J. Wells, T. J. Hope, G. M. Wahl, T. Hunter, i R. Fukunaga, “PRC1,” *Molecular Cell*, sv. 2, br. 6, str. 877–885, 1998.
- [32] P. Bieling, I. A. Telley, i T. Surrey, “A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps,” *Cell*, sv. 142, br. 3, str. 420–432, 2010.

- [33] C. Mollinari, J.-P. Kleman, W. Jiang, G. Schoehn, T. Hunter, i R. L. Margolis, “PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone,” *The Journal of cell biology*, sv. 157, br. 7, str. 1175–1186, 2002.
- [34] J. Kajtez, A. Solomatina, M. Novak, B. Polak, K. Vukušić, J. Rüdiger, G. Cojoc, A. Milas, I. Š. Šestak, P. Risteski, F. Tavano, A. H. Klemm, E. Roscioli, J. Welburn, D. Cimini, M. Glunčić, N. Pavin, i I. M. Tolić, “Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores,” *Nature Communications*, sv. 7, br. 1, str. 10298, 2016.
- [35] A. Musacchio i A. Desai, “A molecular view of kinetochore assembly and function,” *Biology*, sv. 6, br. 1, str. 5, 2017.
- [36] D. Eshel, L. A. Urrestarazu, S. Vissers, J. C. Jauniaux, J. C. van Vliet-Reedijk, R. J. Planta, i I. R. Gibbons, “Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, sv. 90, str. 11172–11176, Dec. 1993.
- [37] J. R. McIntosh i S. C. Landis, “The distribution of spindle microtubules during mitosis in cultured human cells,” *The Journal of cell biology*, sv. 49, br. 2, str. 468–497, 1971.
- [38] J. R. McIntosh, Z. Cande, J. Snyder, i K. Vanderslice, “Studies on the Mechanism of Mitosis,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, sv. 253, br. 1, str. 407–427, 1975.
- [39] B. Polak, P. Risteski, S. Lesjak, i I. M. Tolić, “PRC 1-labeled microtubule bundles and kinetochore pairs show one-to-one association in metaphase,” *EMBO reports*, sv. 18, str. 217–230, Feb. 2017.
- [40] D. N. Mastronarde, K. L. McDonald, R. Ding, i J. R. McIntosh, “Interpolar spindle microtubules in PTK cells.,” *Journal of Cell Biology*, sv. 123, br. 6, str. 1475–1489, 1993.
- [41] R. Ding, K. L. McDonald, i J. R. McIntosh, “Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe.*,” *Journal of Cell Biology*, sv. 120, br. 1, str. 141–151, 1993.

- [42] H. Maiato, A. Gomes, F. Sousa, i M. Barisic, “Mechanisms of chromosome congression during mitosis,” *Biology*, sv. 6, br. 4, str. 13, 2017.
- [43] C. L. Rieder, R. W. Cole, A. Khodjakov, i Sluder, “The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores,” *J Cell Biol*, sv. 130, br. 4, str. 941–948, 1995.
- [44] X. Li i R. B. Nicklas, “Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint,” *Nature*, sv. 373, br. 6515, str. 630–632, 1995.
- [45] I. Matos, A. J. Pereira, M. Lince-Faria, L. A. Cameron, E. D. Salmon, i H. Maiato, “Synchronizing chromosome segregation by flux-dependent force equalization at kinetochores,” *Journal of Cell Biology*, sv. 186, br. 1, str. 11–26, 2009.
- [46] J. M. King i R. B. Nicklas, “Tension on chromosomes increases the number of kinetochore microtubules but only within limits,” *Journal of Cell Science*, sv. 113, br. 21, str. 3815–3823, 2000.
- [47] B. Akiyoshi, K. K. Sarangapani, A. F. Powers, C. R. Nelson, S. L. Reichow, H. Arellano-Santoyo, T. Gonen, J. A. Ranish, C. L. Asbury, i S. Biggins, “Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments,” *Nature*, sv. 468, br. 7323, str. 576–579, 2010.
- [48] C. L. Rieder, E. A. Davison, L. C. Jensen, L. Cassimeris, i E. D. Salmon, “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*, sv. 103, br. 2, str. 581–591, 1986.
- [49] C. Rieder i E. Salmon, “Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle,” *The Journal of cell biology*, sv. 124, br. 3, str. 223–233, 1994.
- [50] A. S. Bajer, “Functional autonomy of monopolar spindle and evidence for oscillatory movement in mitosis.,” *The Journal of cell biology*, sv. 93, br. 1, str. 33–48, 1982.
- [51] A. S. Bajer i J. Mole-Bajer, *Spindle Dynamics and Chromosome Movements*, sv. Suppl. 3 of *International Review of Cytology*. New York and London: Academic Press, 1972.

- [52] S. Z. Wang i R. Adler, “Chromokinesin: A DNA-binding, kinesin-like nuclear protein,” *The Journal of cell biology*, sv. 128, br. 5, str. 761–768, 1995.
- [53] S. Cai, C. B. O’Connell, A. Khodjakov, i C. E. Walczak, “Chromosome congression in the absence of kinetochore fibres,” *Nature Cell Biology*, sv. 11, br. 7, str. 832–838, 2009.
- [54] M. Barisic, P. Aguiar, S. Geley, i H. Maiato, “Kinetochore motors drive congression of peripheral polar chromosomes by overcoming random arm-ejection forces,” *Nature Cell Biology*, sv. 16, br. 12, str. 1249–1256, 2014.
- [55] K. Vukušić i I. M. Tolić, “CENP-E initiates chromosome congression by opposing aurora kinases to promote end-on microtubule attachments close to centrosomes,” 2023. bioRxiv: 2023.10.19.563150.
- [56] S. Inoué, “The effect of colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle,” *Experimental Cell Research*, sv. 2, str. 305–318, 1952.
- [57] D. E. Koshland, T. J. Mitchison, i M. W. Kirschner, “Polewards chromosome movement driven by microtubule depolymerization in vitro,” *Nature*, sv. 331, br. 6156, str. 499–504, 1988.
- [58] M. Coue, V. A. Lombillo, i J. R. McIntosh, “Microtubule depolymerization promotes particle and chromosome movement in vitro.,” *The Journal of cell biology*, sv. 112, br. 6, str. 1165–1175, 1991.
- [59] E. L. Grishchuk, M. I. Molodtsov, F. I. Ataullakhanov, i J. R. McIntosh, “Force production by disassembling microtubules,” *Nature*, sv. 438, br. 7066, str. 384–388, 2005.
- [60] V. Varga, J. Helenius, K. Tanaka, A. A. Hyman, T. U. Tanaka, i J. Howard, “Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner,” *Nature Cell Biology*, sv. 8, br. 9, str. 957–962, 2006.
- [61] R. R. West, T. Malmstrom, i J. R. McIntosh, “Kinesins klp5+ and klp6+ are required for normal chromosome movement in mitosis,” *Journal of Cell Science*, sv. 115, br. 5, str. 931–940, 2002.
- [62] M. A. Garcia, N. Koonrungsa, i T. Toda, “Two kinesin-like kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A,” *Current Biology*, sv. 12, br. 8, str. 610–621, 2002.

- [63] J. Stumpff, G. von Dassow, M. Wagenbach, C. Asbury, i L. Wordeman, “The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment,” *Developmental Cell*, sv. 14, br. 2, str. 252–262, 2008.
- [64] J. Stumpff, M. Wagenbach, A. Franck, C. L. Asbury, i L. Wordeman, “Kif18a and chromokinesins confine centromere movements via microtubule growth suppression and spatial control of kinetochore tension,” *Developmental Cell*, sv. 22, br. 5, str. 1017–1029, 2012.
- [65] P. Risteski, D. Božan, M. Jagrić, A. Bosilj, N. Pavin, i I. M. Tolić, “Length-dependent poleward flux of sister kinetochore fibers promotes chromosome alignment,” *Cell Reports*, sv. 40, br. 5, str. 111169, 2022.
- [66] G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2. izd., 2000.
- [67] J. Howard, *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sunderland, Mass: Sinauer, nachdr. izd., 2001.
- [68] B. Mickey i J. Howard, “Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents.,” *The Journal of cell biology*, sv. 130, br. 4, str. 909–917, 1995.
- [69] H. Tomari, K. Honjo, K. Kunitake, N. Aramaki, S. Kuhara, N. Hidaka, K. Nishimura, Y. Nagata, i T. Horiuchi, “Meiotic spindle size is a strong indicator of human oocyte quality,” *Reproductive Medicine and Biology*, sv. 17, br. 3, str. 268–274, 2018.
- [70] F. Verde, M. Dogterom, E. Stelzer, E. Karsenti, i S. Leibler, “Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in xenopus egg extracts.,” *The Journal of cell biology*, sv. 118, br. 5, str. 1097–1108, 1992.
- [71] M. Dogterom i S. Leibler, “Physical aspects of the growth and regulation of microtubule structures,” *Physical Review Letters*, sv. 70, br. 9, str. 1347–1350, 1993.
- [72] K. Ishihara, K. S. Korolev, i T. J. Mitchison, “Physical basis of large microtubule aster growth,” *eLife*, sv. 5, 2016.
- [73] A. F. Long, P. Suresh, i S. Dumont, “Individual kinetochore-fibers locally dissipate force to maintain robust mammalian spindle structure,” *The Journal of Cell Biology*, sv. 219, br. 8, str. e201911090, 2020.

- [74] L. C. Kapitein, E. J. G. Peterman, B. H. Kwok, J. H. Kim, T. M. Kapoor, i C. F. Schmidt, “The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks,” *Nature*, sv. 435, br. 7038, str. 114–118, 2005.
- [75] J. E. Scholey, S. Nithianantham, J. M. Scholey, i J. Al-Bassam, “Structural basis for the assembly of the mitotic motor kinesin-5 into bipolar tetramers,” *eLife*, sv. 3, str. e02217, 2014.
- [76] J. Howard, “Mechanics of motor proteins,” in *Physics of Bio-Molecules and Cells. Physique des biomolécules et des cellules* (F. Flyvbjerg, F. Jülicher, P. Ormos, i F. David, eds.), sv. 75, str. 69–94, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002.
- [77] E. Meyhöfer i J. Howard, “The force generated by a single kinesin molecule against an elastic load..,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, sv. 92, br. 2, str. 574–578, 1995.
- [78] V. Bormuth, V. Varga, J. Howard, i E. Schäffer, “Protein Friction Limits Diffusive and Directed Movements of Kinesin Motors on Microtubules,” *Science*, sv. 325, str. 870–873, Aug. 2009.
- [79] D. Johann, D. Goswami, i K. Kruse, “Generation of Stable Overlaps between Anti-parallel Filaments,” *Physical Review Letters*, sv. 115, br. 11, str. 118103, 2015.
- [80] M. Lera-Ramirez i F. J. Nédélec, “Theory of antiparallel microtubule overlap stabilization by motors and diffusible crosslinkers,” *Cytoskeleton*, sv. 76, br. 11-12, str. 600–610, 2019.
- [81] F. Nédélec, “Computer simulations reveal motor properties generating stable anti-parallel microtubule interactions,” *Journal of Cell Biology*, sv. 158, br. 6, str. 1005–1015, 2002.
- [82] R. Loughlin, R. Heald, i F. Nédélec, “A computational model predicts Xenopus meiotic spindle organization,” *Journal of Cell Biology*, sv. 191, br. 7, str. 1239–1249, 2010.
- [83] L. Winters, I. Ban, M. Prelogović, I. Kalinina, N. Pavin, i I. M. Tolić, “Pivoting of microtubules driven by minus-end-directed motors leads to spindle assembly,” *BMC Biology*, sv. 17, br. 1, str. 42, 2019.

- [84] A. R. Lamson, C. J. Edelmaier, M. A. Glaser, i M. D. Betterton, “Theory of cytoskeletal reorganization during cross-linker-mediated mitotic spindle assembly,” *Biophysical Journal*, sv. 116, br. 9, str. 1719–1731, 2019.
- [85] T. E. Holy i S. Leibler, “Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, sv. 91, br. 12, str. 5682–5685, 1994.
- [86] R. Wollman, E. Cytrynbaum, J. Jones, T. Meyer, J. Scholey, i A. Mogilner, “Efficient chromosome capture requires a bias in the ‘search-and-capture’ process during mitotic-spindle assembly,” *Current Biology*, sv. 15, br. 9, str. 828–832, 2005.
- [87] R. Paul, R. Wollman, W. T. Silkworth, I. K. Nardi, D. Cimini, i A. Mogilner, “Computer simulations predict that chromosome movements and rotations accelerate mitotic spindle assembly without compromising accuracy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, sv. 106, br. 37, str. 15708–15713, 2009.
- [88] I. Kalinina, A. Nandi, P. Delivani, M. R. Chacón, A. H. Klemm, D. Ramunno-Johnson, A. Krull, B. Lindner, N. Pavlin, i I. M. Tolić -Nørrelykke, “Pivoting of microtubules around the spindle pole accelerates kinetochore capture,” *Nature Cell Biology*, sv. 15, br. 1, str. 82–87, 2013.
- [89] A. V. Zaytsev i E. L. Grishchuk, “Basic mechanism for biorientation of mitotic chromosomes is provided by the kinetochore geometry and indiscriminate turnover of kinetochore microtubules,” *Molecular Biology of the Cell*, sv. 26, br. 22, str. 3985–3998, 2015.
- [90] C. Edelmaier, A. R. Lamson, Z. R. Gergely, S. Ansari, R. Blackwell, J. R. McIntosh, M. A. Glaser, i M. D. Betterton, “Mechanisms of chromosome biorientation and bipolar spindle assembly analyzed by computational modeling,” *eLife*, sv. 9, str. e48787, 2020.
- [91] E. Kliuchnikov, A. Zhmurov, K. A. Marx, A. Mogilner, i V. Barsegov, “Cell-DynaMo—stochastic reaction-diffusion-dynamics model: Application to search-and-capture process of mitotic spindle assembly,” *PLOS Computational Biology*, sv. 18, br. 6, str. e1010165, 2022.
- [92] J. R. McIntosh, M. I. Molodtsov, i F. I. Ataullakhanov, “Biophysics of mitosis,” *Quarterly Reviews of Biophysics*, sv. 45, br. 2, str. 147–207, 2012.

- [93] B. L. Sprague, C. G. Pearson, P. S. Maddox, K. S. Bloom, E. Salmon, i D. J. Odde, “Mechanisms of microtubule-based kinetochore positioning in the yeast metaphase spindle,” *Biophysical Journal*, sv. 84, br. 6, str. 3529–3546, 2003.
- [94] M. K. Gardner, C. G. Pearson, B. L. Sprague, T. R. Zarzar, K. Bloom, E. D. Salmon, i D. J. Odde, “Tension-dependent regulation of microtubule dynamics at kinetochores can explain metaphase congression in yeast,” *Molecular Biology of the Cell*, sv. 16, br. 8, str. 3764–3775, 2005.
- [95] M. K. Gardner, D. C. Bouck, L. V. Paliulis, J. B. Meehl, E. T. O'Toole, J. Haase, A. Soubry, A. P. Joglekar, M. Winey, E. D. Salmon, K. Bloom, i D. J. Odde, “Chromosome congression by kinesin-5 motor-mediated disassembly of longer kinetochore microtubules,” *Cell*, sv. 135, br. 5, str. 894–906, 2008.
- [96] H. Mary, J. Fouchard, G. Gay, C. Reyes, T. Gauthier, C. Gruget, J. Pécréaux, S. Tournier, i Y. Gachet, “Fission yeast kinesin-8 controls chromosome congression independently of oscillations,” *Journal of Cell Science*, sv. 128, br. 20, str. 3720–3730, 2015.
- [97] Z. R. Gergely, A. Crapo, L. E. Hough, J. R. McIntosh, i M. D. Betterton, “Kinesin-8 effects on mitotic microtubule dynamics contribute to spindle function in fission yeast,” *Molecular Biology of the Cell*, sv. 27, br. 22, str. 3490–3514, 2016.
- [98] A. P. Joglekar i A. J. Hunt, “A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements,” *Biophysical Journal*, sv. 83, br. 1, str. 42–58, 2002.
- [99] G. Civelekoglu-Scholey, D. Sharp, A. Mogilner, i J. Scholey, “Model of chromosome motility in drosophila embryos: Adaptation of a general mechanism for rapid mitosis,” *Biophysical Journal*, sv. 90, br. 11, str. 3966–3982, 2006.
- [100] G. Civelekoglu-Scholey, B. He, M. Shen, X. Wan, E. Roscioli, B. Bowden, i D. Cimini, “Dynamic bonds and polar ejection force distribution explain kinetochore oscillations in PtK1 cells,” *Journal of Cell Biology*, sv. 201, br. 4, str. 577–593, 2013.
- [101] J. W. Armond, E. F. Harry, A. D. McAinsh, i N. J. Burroughs, “Inferring the forces controlling metaphase kinetochore oscillations by reverse engineering system dynamics,” *PLOS Computational Biology*, sv. 11, br. 11, str. e1004607, 2015.

- [102] E. Kliuchnikov, K. A. Marx, A. Mogilner, i V. Barsegov, “Interrelated effects of chromosome size, mechanics, number, location-orientation and polar ejection force on the spindle accuracy: a 3d computational study,” *Molecular Biology of the Cell*, sv. 34, br. 6, 2023.
- [103] D. T. Miyamoto, Z. E. Perlman, K. S. Burbank, A. C. Groen, i T. J. Mitchison, “The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles,” *The Journal of Cell Biology*, sv. 167, br. 5, str. 813–818, 2004.
- [104] I. Brust-Mascher, P. Sommi, D. K. Cheerambathur, i J. M. Scholey, “Kinesin-5-dependent poleward flux and spindle length control in *drosophila* embryo mitosis,” *Molecular Biology of the Cell*, sv. 20, br. 6, str. 1749–1762, 2009.
- [105] Y. Shimamoto, S. Forth, i T. M. Kapoor, “Measuring pushing and braking forces generated by ensembles of kinesin-5 crosslinking two microtubules,” *Developmental Cell*, sv. 34, br. 6, str. 669–681, 2015.
- [106] M. W. Elting, M. Prakash, D. B. Udy, i S. Dumont, “Mapping load-bearing in the mammalian spindle reveals local kinetochore fiber anchorage that provides mechanical isolation and redundancy,” *Current Biology*, sv. 27, br. 14, str. 2112–2122.e5, 2017.
- [107] I. Sigmund, D. Božan, I. Šarić, i N. Pavin, “Mechanisms of chromosome positioning during mitosis,” *PRX Life*, sv. 2, str. 043017, 2024.
- [108] J. Matković, S. Ghosh, M. Ćosić, S. Eibes, M. Barišić, N. Pavin, i I. M. Tolić, “Kinetochore- and chromosome-driven transition of microtubules into bundles promotes spindle assembly,” *Nature Communications*, sv. 13, br. 1, str. 7307, 2022.
- [109] J. G. DeLuca, Y. Dong, P. Hergert, J. Strauss, J. M. Hickey, E. D. Salmon, i B. F. McEwen, “Hec1 and Nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites,” *Molecular Biology of the Cell*, sv. 16, br. 2, str. 519–531, 2005.
- [110] L. Kabeche i D. A. Compton, “Cyclin A regulates kinetochore microtubules to promote faithful chromosome segregation,” *Nature*, sv. 502, br. 7469, str. 110–113, 2013.
- [111] M. I. Anjur-Dietrich, C. P. Kelleher, i D. J. Needleman, “Mechanical mechanisms of chromosome segregation,” *Cells*, sv. 10, br. 2, str. 465, 2021.

- [112] N. Yamashita, M. Morita, W. R. Legant, B.-C. Chen, E. Betzig, H. Yokota, i Y. Mimori-Kiyosue, “Three-dimensional tracking of plus-tips by lattice light-sheet microscopy permits the quantification of microtubule growth trajectories within the mitotic apparatus,” *Journal of Biomedical Optics*, sv. 20, br. 10, str. 101206, 2015.
- [113] S. J. Klaasen, M. A. Truong, R. H. van Jaarsveld, I. Koprivec, V. Štimac, S. G. de Vries, P. Risteski, S. Kodba, K. Vukušić, K. L. de Luca, J. F. Marques, E. M. Gerrits, B. Bakker, F. Foijer, J. Kind, I. M. Tolić , S. M. A. Lens, i G. J. P. L. Kops, “Nuclear chromosome locations dictate segregation error frequencies,” *Nature*, sv. 607, br. 7919, str. 604 – 609, 2022.
- [114] M. T. Valentine, P. M. Fordyce, T. C. Krzysiak, S. P. Gilbert, i S. M. Block, “Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro,” *Nature Cell Biology*, sv. 8, br. 5, str. 470–476, 2006.
- [115] X. Yao, K. L. Anderson, i D. W. Cleveland, “The microtubule-dependent motor centromere–associated protein E (CENP-E) is an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules,” *The Journal of Cell Biology*, sv. 139, br. 2, str. 435–447, 1997.
- [116] H. Yardimci, M. van Duffelen, Y. Mao, S. S. Rosenfeld, i P. R. Selvin, “The mitotic kinesin CENP-E is a processive transport motor,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, sv. 105, br. 16, str. 6016–6021, 2008.
- [117] Y. Du, C. A. English, i R. Ohi, “The kinesin-8 kif18a dampens microtubule plus-end dynamics,” *Current Biology*, sv. 20, br. 4, str. 374–380, 2010.
- [118] J. Stumpff, Y. Du, C. A. English, Z. Maliga, M. Wagenbach, C. L. Asbury, L. Woldeman, i R. Ohi, “A tethering mechanism controls the processivity and kinetochore-microtubule plus-end enrichment of the kinesin-8 kif18a,” *Molecular Cell*, sv. 43, br. 5, str. 764–775, 2011.
- [119] P. Blanchard, R. Devaney, i G. Hall, *Differential Equations*. Thomson Brooks/Cole, 2006.
- [120] E. Vladimirov, N. Mchedlishvili, I. Gasic, J. W. Armond, C. P. Samora, P. Meraldi, i A. D. McAinsh, “Nonautonomous movement of chromosomes in mitosis,” *Developmental Cell*, sv. 27, br. 1, str. 60–71, 2013.

- [121] D. Cimini, B. Howell, P. Maddox, A. Khodjakov, F. Degrassi, i E. Salmon, “Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells,” *The Journal of Cell Biology*, sv. 153, br. 3, str. 517–528, 2001.
- [122] G. Cojoc, E. Roscioli, L. Zhang, A. García-Ulloa, J. V. Shah, M. W. Berns, N. Pavin, D. Cimini, I. M. Tolić, i J. Gregan, “Laser microsurgery reveals conserved viscoelastic behavior of the kinetochore,” *Journal of Cell Biology*, sv. 212, br. 7, str. 767–776, 2016.
- [123] R. B. Nicklas, “How cells get the right chromosomes,” *Science*, sv. 275, br. 5300, str. 632–637, 1997.
- [124] S. Biggins, F. F. Severin, N. Bhalla, I. Sasoon, A. A. Hyman, i A. W. Murray, “The conserved protein kinase ip1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast,” *Genes & Development*, sv. 13, br. 5, str. 532–544, 1999.
- [125] T. U. Tanaka, N. Rachidi, C. Janke, G. Pereira, M. Galova, E. Schiebel, M. Stark, i K. Nasmyth, “Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections,” *Cell*, sv. 108, br. 3, str. 317–329, 2002.
- [126] A. K. de Regt, C. J. Clark, C. L. Asbury, i S. Biggins, “Tension can directly suppress Aurora B kinase-triggered release of kinetochore-microtubule attachments,” *Nature Communications*, sv. 13, br. 1, str. 2152, 2022.
- [127] S. Chatterjee, A. Sarkar, J. Zhu, A. Khodjakov, A. Mogilner, i R. Paul, “Mechanics of multicentrosomal clustering in bipolar mitotic spindles,” *Biophysical Journal*, sv. 119, br. 2, str. 434–447, 2020.
- [128] M. Schelski i F. Bradke, “Microtubule retrograde flow retains neuronal polarization in a fluctuating state,” *Science Advances*, sv. 8, br. 44, str. eab02336, 2022.
- [129] A. Bhartiya, D. Batey, S. Cipiccia, X. Shi, C. Rau, S. Botchway, M. Yusuf, i I. K. Robinson, “X-ray Ptychography Imaging of Human Chromosomes After Low-dose Irradiation,” *Chromosome Research*, sv. 29, br. 1, str. 107–126, 2021.
- [130] R. B. Nicklas, “Chromosome velocity during mitosis as a function of chromosome size and position,” *The Journal of Cell Biology*, sv. 25, br. 1, str. 119–135, 1965.

Curriculum vitae

Ivan Sigmund rođen je 2. siječnja 1991. godine u Hrvatskoj. Pohađao je Isusovačku klasičnoj gimnaziji u Osijeku od 2005. do 2009. godine. Nakon toga je upisao studij fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je 2014. godine stekao titulu magistra fizike obranivši rad pod naslovom "Spinori u općoj teoriji relativnosti" pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Smolića. Svoje obrazovanje dodatno je proširio dvogodišnjim studijem filozofije na Filozofsko-teološkom institutu Družbe Isusove u Zagrebu (2016.-2018.). Od veljače 2021. radi kao asistent na Prirodoslovno matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje se bavi razvojem matematičkog modela formiranja veza mikrotubula i kromosoma te istražuje sile odgovorne za pozicioniranje kromosoma u prometafazi. Tokom svog rada na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, držao je vježbe iz više kolegija. Ukupno četiri semestra je vodio vježbe iz kolegija "Fizika (112578)". Također, držao je vježbe iz kolegija "Početni fizički praktikum 1 (40630)" te dva semestra vježbe iz kolegija "Računarstvo i praktikum (63123)".

Znanstveni radovi

- I. Sigmund, D. Božan, I. Šarić, i N. Pavin, "Mechanisms of chromosome positioning during mitosis," PRX Life, sv. 2, str. 043017, 2024.

Konferencije

- **04/2023** Mitotic spindle: From living and synthetic systems to theory, Dubrovnik
Poster: "Theoretical model reveals significance of microtubules poleward flux in chromosome congression"
- **09/2022** DPG Meeting of the Condensed Matter Section (SKM), Regensburg
Predavanje: "Theoretical model reveals significance of microtubules poleward flux in chromosome congression"