

Proučavanje kolektivnog djelovanja motornih proteina u antiparalelnom preklopu mikrotubula na centriranje kinetohora u diobenom vretenu

Denis Radolović*

*Prirodoslovno-matematički fakultet, Fizički odsjek
Bijenička cesta 32, 10000 Zagreb*

Mentor: prof. dr. sc. Nenad Pavin

*Prirodoslovno-matematički fakultet, Fizički odsjek
Bijenička cesta 32, 10000 Zagreb*

21. siječnja 2024.

Sažetak

Predložen je teorijski model za centriranje kinetohora (tj. kromosoma) u metafaznu ravninu prilikom stanične diobe temeljen na toku (eng. *flux*) kinetohornih i premosnih mikrotubula. Interakcijom kinetohornih i premosnih mikrotubula uspostavlja se razlika u brzini toka sestrinskih kinetohornih vlakana - dulje vlakno „teče” brže čime dolazi do centriranja kinetohora. Jednadžbe koje opisuju model riješene su numerički za različite parametre, a time je ujedno provjerena robusnost modela.

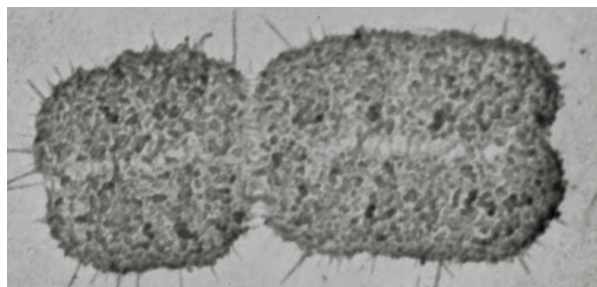
1 Uvod

1.1 Elementi fizikalnog sustava

1.1.1 Kromosomi

Stanična dioba ključan je proces za nastanak i održavanje života na Zemlji. Premda su brojna istraživanja proučavala taj proces, biološki i fizikalni mehanizmi u njegovoj pozadini još uvijek nisu sasvim rasvijetljeni.

Informacija potrebna za sintezu proteina, osnovnih gradivnih i funkcionalnih elemenata stanice sadržana je u molekuli DNK unutar stanične jezgre [2]. DNK molekula je dugačak linearni polimer, a u jezgri se pojavljuje u obliku kromosoma. Svaki kromosom sadrži dvije identične molekule DNK kondenzirane u tzv. *sestrinske kromatide*. Suženje na kromosomu je mjesto najjačeg vezanja sestrinskih kromatida, a naziva se *centromera* (vidi sliku 1) [3].

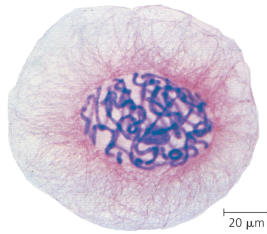


Slika 1: Mikrograf kromosoma u mitozu. Vide se dvije kondenzirane molekule DNK (sestrinske kromatide) spojene duž horizontalne osi na slici. Suženje je centromera, mjesto najjačeg vezanja sestrinskih kromatida. Preuzeto is [2].

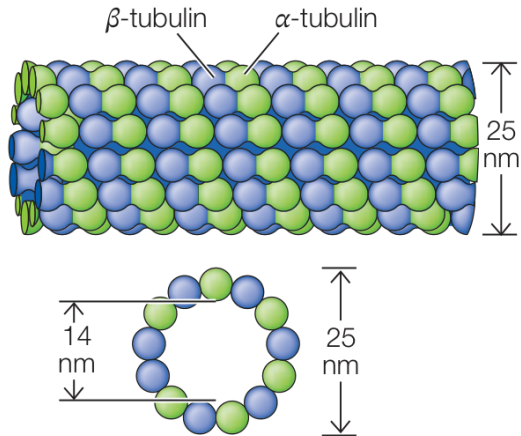
1.1.2 Mikrotubuli i kinetohore

Mikrotubuli su ravni cilindrični polimeri proteina tubulina (slika 3). U stanici služe kao „tračnice”

*dradolov.phy@pmf.hr



Slika 2: Stanica u pripremi za diobu. Vidljivi su djelomično kondenzirani kromosomi obojeni plavom bojom. Crvenom bojom obojen je citoskelet. Preuzeto iz [3].



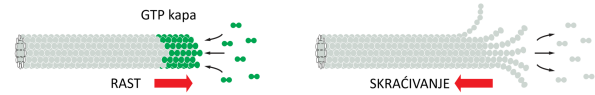
Slika 3: Shematski prikaz mikrotubula. Zelene kuglice predstavljaju α -tubulin, a plave β -tubulin. Preuzeto iz [4].

po kojima se kreću motorni proteini, sudjeluju u određivanju oblika stanice te izgrađuju diobeno vreteno [2, 4].

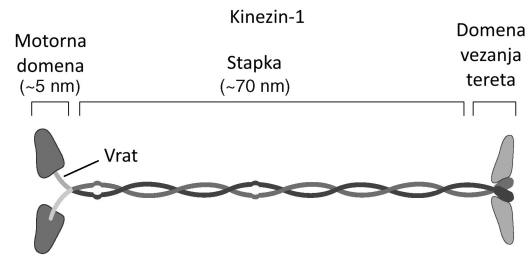
Da bi kondenzirani kromosom mogao ostvariti stabilan kontakt s mikrotubulima, na centromeri svake sestrinske kromatide nastaje proteinska struktura, **kinetohora**, na koju će se mikrotubuli povezati [3].

Važno svojstvo mikrotubula je njihova usmjerenost. Tubulin nije simetričan protein već je sastavljen od dvije podjedinice različitih svojstava, tzv. α - i β -tubulin. Svi su tubulini u mikrotubulu jednako orijentirani, a kraj mikrotubula koji završava β -tubulinom lakše dodaje nove podjedinice od kraja na kojem je izložen α -tubulin [2].

Rezultat ovakve građe jest tzv. *dinamička nestabilnost* mikrotubula (slika 4). Svaki mikrotubul stohastički prelazi iz faze rasta u fazu skraćivanja i obratno [2]. Ono što dinamička priroda mikrotubula omogućava je tzv. *poleward flux*, ovdje preveden kao *tok mikrotubula*. Naime, ako je plus kraj mikrotubula u fazi polimerizacije, a minus kraj u fazi depo-



Slika 4: Shematski prikaz rasta i skraćivanja mikrotubula. Prilagođeno iz [3].



Slika 5: Shema strukture kinezina-1. Prilagođeno iz [5].

limerizacije, postiže se da mikrotubul ostaje konstantne duljine, ali svaka točka (zapravo podjedinica) na mikrotubulu se giba u smjeru minus kraja [2].

1.1.3 Motorni proteini i crosslinkeri

Motorni proteini su posebna skupina funkcionalnih proteina koji izravno pretvaraju kemijsku energiju neke kemijske reakcije u mehanički rad. Neki od njih tu energiju koriste za usmjereno kretanje duž citoskeleta. Dvije familije motornih proteina koriste mikrotubule za kretanje - kinezini i dineini. Dineini „hodažu” prema minus kraju mikrotubula, dok većina kinezina „hoda” prema plus kraju [4].

Kretanje motornih proteina ilustrirat ćemo na primjeru kinezina. Kinezin „hoda” po mikrotubulu na način sličan ljudskom hodu. Dio motora koji se veže na mikrotubul nazivamo glavom motora, dok se suprotni kraj kolokvijalno naziva „rep” (vidi sliku 5). Jedna je glava motora čvrsto vezana na mikrotubul, dok je druga (stražnja) slobodna. Hidrolizom ATP-a u ADP dolazi do promjene u konformaciji proteina te stražnja glava prelazi preko prednje - motor je napravio korak. Na ovaj način motorni proteini izravno pretvaraju kemijsku energiju u mehanički rad [16].

Motorni proteini na svoj „rep” mogu vezati različite terete pa tako sudjeluju u transportu vezikula, makromolekula i organela, pomicanju bičeva i cilija, organizaciji mikrotubula te dinamičnosti diobeno vretena [2, 15].

Brzina koračanja motornih proteina ovisi o brzini kemijske reakcije koja ga pogoni. Na brzinu njezina odvijanja možemo utjecati djelovanjem vanjske sile na sustav. Zamislimo motorni protein ve-

zan na mikrotubul koji može koračati lijevo (minus smjer) ili desno (plus smjer). Kad protein ne bi imao različita konformacijska stanja, vjerojatnosti lijevog i desnog koraka bile bi jednake [11]. Ono što slama simetriju je nužnost hidrolize ATP-a za dio procesa (koračanje). Time korak u jednom smjeru postaje mnogo vjerojatniji nego unatrag iako su mikroskopski oba moguća, samo što je za korak unatrag potrebno spojiti ADP i fosfatnu skupinu u ATP, a za to je potrebno uložiti značajnu energiju. U energijskom krajoliku motora na mikrotubulu ovo možemo prikazati kao niz energijskih jama takvih da je prelazak iz neke jame u susjednu energijski povoljniji ako je korak motora u plus smjeru (slika 6). Boltzmannov zakon za sustav u kontaktu s rezervoarom daje nam omjer $k_+/k_- = e^{-\beta\Delta G}$, gdje je $\Delta G = G_{n+1} - G_n$ razlika slobodnih energija susjednih jama, k_+ broj koraka u plus smjeru u jedinici vremena, a k_- broj koraka u minus smjeru u jedinici vremena [11].

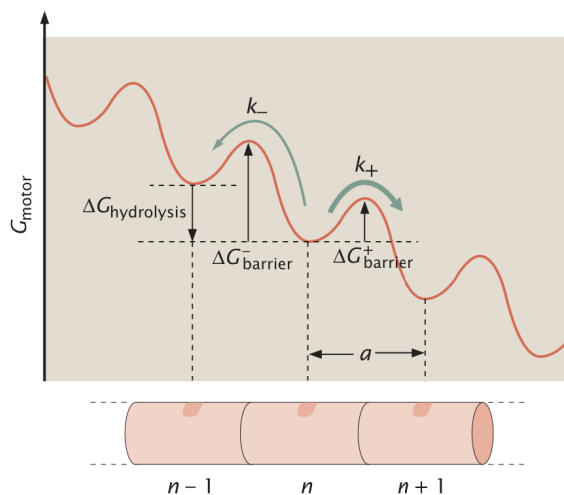
Primjenom vanjske sile F u minus smjeru na motor, rad koji bi on morao obaviti suprotstavljajući joj se duž koraka duljine a je $W = F \cdot a$. Slobodna energija n -tog u odnosu na $n + 1$ -vo stanje je tada promijenjena za W te imamo $k_+(F)/k_-(F) = e^{-\beta(\Delta G + Fa)}$ [11]. Tako je silom moguće mijenjati vjerojatnost koračanja motora u nekom smjeru. Ovisnost brzine koračanja o sili matematički je zapisana u tzv. **force-velocity relaciji**. U stanici silu stvara teret vezan na „rep” motora. Ako je sila dovoljno velika, vjerojatnost koraka unatrag postat će jednaka vjerojatnosti koraka unaprijed. Tu vrijednost sile nazivamo zaustavna sila (eng. „stall force”) [11].

Osim aktivnih motornih proteina, vezu između mikrotubula postižu i pasivni elementi, tzv. *crosslinkeri*. Oni povezuju susjedne mikrotubule djelujući na njih silom ako između njih postoji razlika u brzinama njihovog toka [17].

1.1.4 Diobeno vreteno

Kako bi provela diobu genetskog materijala stanica gradi **diobeno vreteno**, biološki stroj sastavljen od mikrotubula (slika 7). Središnji dio diobenog vretena čine usmjereni mikrotubuli. Minus krajevi su usidreni na polovima, a plus krajevi su usmjereni prema središtu vretena. Mikrotubuli koji dolaze do kinetohora i vežu se na njih nazivaju se *kinetohorni mikrotubuli*, a oni koji nailaze na plus krajeve mikrotubula sa suprotnog pola nazivaju se *premosni* ili *interpolarni mikrotubuli*. Ostale mikrotubule koji rastu iz polova vretena zovemo *astralnim mikrotubulima* [2].

Diobeno vreteno u stanici osigurava pravilnu raspodjelu i orijentaciju kromosoma u jednoj ravnini kako bi se sestrinske kromatide mogle kontrolirano



Slika 6: Shema ovisnosti slobodne energije o položaju duž mikrotubula za motorni protein s hidrolizom ATP-a. $G = U - TS$ označava slobodnu energiju, U je unutarnja energija, T termodinamička temperatura, a S entropija. Preuzeto iz [11].

odvojiti i doći do suprotnih polova vretena. Vreteno se tijekom mitoze mijenja i prilagođava svoj oblik i duljinu dok se ne postigne potrebna organizacija kromosoma za diobu [2]. Ovakvo složeno ponašanje vretena teško je zamislivo bez dinamičke prirode mikrotubula, motornih proteina i ostalih elemenata vretena.

1.2 Mitoza

Stanični ciklus dijeli se na dva osnovna dijela - vrijeme rasta stanice i udvostručenja DNK u pripremi za diobu, tzv. *interfaza*, te samu diobu, odnosno *mitozu* [4].

Kao primjer vremenskih skala relevantnih za stanicu, uzmimo neku ljudsku stanicu koja se dijeli svaka 24 sata. Od tog vremena, mitozu zauzima manje od jednog sata, dok je ostatak vremena stanica u interfazi [3].

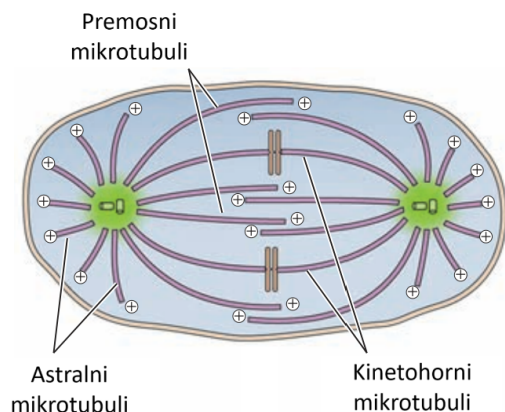
Mitozu dijelimo na 5 faza [3]:

1. Profaza

- Kromatinska vlakna se kondenziraju u diskretne kromosome opazive svjetlosnim mikroskopom.
- Započinje formiranje diobenog vretena.

2. Prometafaza

- Nestaje jezgrina ovojnica čime se oslobađaju kromosomi.
- Formiraju se kinetohore na svakoj sestrinskoj kromatidi.



Slika 7: Shema diobenog vretena. Iako su svi mikrotubuli diobenog vretena isti biološki elementi, funkcija im je različita - neki su spojeni na kinetohore, drugi nailaze na mikrotubule sa suprotnog pola, a neki pak rastu prema staničnom korteksu (unutar-nji rub stanice). Prilagođeno iz [4].

- Neki od mikrotubula nailaze na kinetohore te se s njima vežu.

3. Metafaza

- Centrosomi su na suprotnim polovima stanice.
- Kromosomi su poravnati u *metafaznu ravninu*, zamišljenu ravninu jednako udaljenu od svakog pola diobenog vretena.
- Kinetohore svakog kromosoma su kinetohornim mikrotubulima povezane s nasuprotnim polovima diobenog vretena.

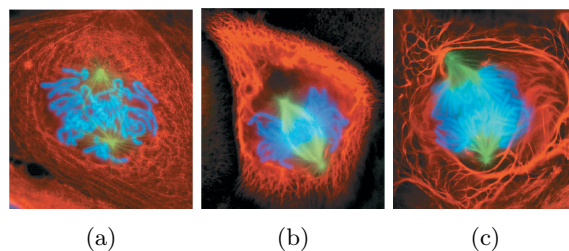
4. Anafaza

- Kinetohorni mikrotubuli skraćivanjem razdvajaju sestrinske kromatide.

5. Telofaza

- Dvije nove jezgre se formiraju unutar stanice, po jedna za svaku skupinu kromosoma.
- Kromosomi se dekondenziraju.
- Mikrotubuli se depolimeriziraju.

Telofazom završava mitoza. Stanica ubrzo nakon kraja mitoze dovršava citokinezu, dijeljenje citoplazme i odvajanje novonastalog para stanica kćeri [3].

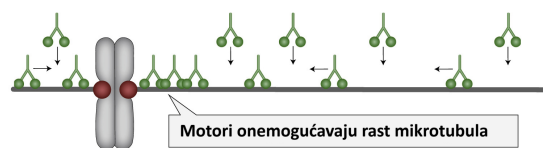


Slika 8: Središnje faze mitoze. Slika (a) prikazuje prometafazu, (b) metafazu, (c) anafazu. Mikrofotografi preuzeti iz [3].

2 Dosadašnji modeli sila tijekom diobe

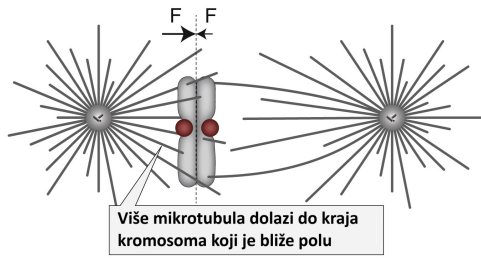
Dva su glavna dosad poznata mehanizma centriranja kromosoma u metafaznu ravninu temeljena na interakciji mikrotubula i kinetohora ili kromosoma [8, 10, 13]. Jačina oba mehanizma ovisi o udaljenosti kinetohore/kromosoma od pripadnog pola diobenog vretena, tj. duljini mikrotubula.

U prvom mehanizmu (slika 9), kinetohorni mikrotubul depolimerizacijom na plus kraju, koji je učvršćen na kinetohoru, djeluje silom na kinetohoru u smjeru pripadnog pola. Depolimerizacija mikrotubula sama po sebi ne ovisi o njegovoj duljini, ali indirektno postaje osjetljiva na duljinu mikrotubula posredovanjem motornih proteina koji „hodaju” prema plus kraju mikrotubula i dolaskom na plus kraj kataliziraju depolimerizaciju. Dulji mikrotubul će tako na sebe vezati više motornih proteina koji će se akumulirati na plus kraju i povećati vjerojatnost depolimerizacije rezultirajući većom silom povlačenja s one strane na kojoj je kinetohorni mikrotubul dulji [13].



Slika 9: Shema mehanizma centriranja skraćivanjem kinetohornih mikrotubula. Na duljem mikrotubulu se nakuplja više motornih proteina koji povećavaju vjerojatnost depolimerizacije. Dulji mikrotubul se stoga češće skraćuje i povlači kinetohoru za sobom. Sile lijevog i desnog mikrotubula su izjednačene kad je kinetohora u središtu vretena. Prilagođeno iz [13].

Drugi mehanizam temelji se na tzv. „polarnim silama izbacivanja” (eng. „*polar ejection forces*”). Njih uzrokuju astralni mikrotubuli (oni koji se ne vežu na kinetohoru niti na mikrotubul sa suprotnog



Slika 10: Shema mehanizma polarnih sila izbacivanja (eng. „polar ejection forces”). Kromosom bliže polu „vidi” više mikrotubula koji ga odmiču od pola. Ukupna sila djeluje prema centru vretena. Prilagođeno iz [13].

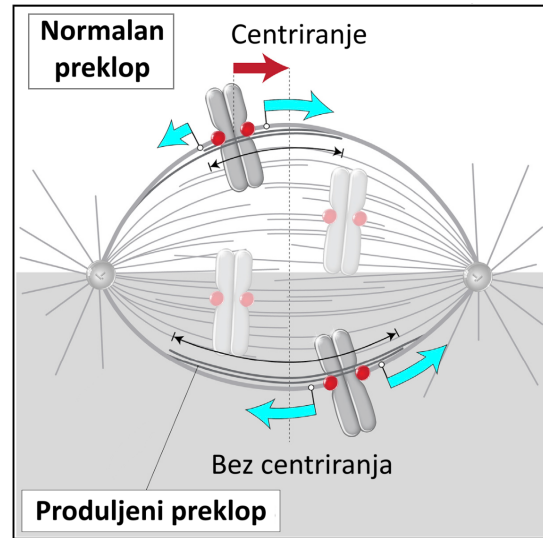
pola). Kako mikrotubuli rastu radijalno iz centrosoma njihova gustoća bit će to veća što smo centrosomu bliže (slika 10). Ako kromosom nije u centru diobenog vretena, do njega će doći veći broj astralnih mikrotubula sa strane bliže polu. Shodno tome, sila „guranja” će biti usmjerena prema centru diobenog vretena [10, 13].

3 Model centriranja temeljen na toku mikrotubula

3.1 Uvod

Eksperimenti su pokazali da uz navedene mehanizme povlačenja kinetohora od strane kinetohornih mikrotubula i polarnih sila izbacivanja (eng. „polar ejection forces”) postoje i sile povezane s tokom mikrotubula prema polovima [7, 9, 14]. Prisjetimo se, do toka mikrotubula dolazi zbog sile klizanja koju stvaraju motorni proteini u antiparalelnom preklopu te istovremenim dodavanjem tubulinskih podjedinica na plus kraju (polimerizacija) i odvajanjem podjedinica s minus kraja (depolimerizacija). Par susjednih mikrotubula s jednako usmjerenim plus krajevima nazivamo *paralelnim*, a one sa suprotno usmjerenim plus krajevima *antiparalelnim* mikrotubulima. Mikrotubul stoga možemo zamisliti kao pokretnu traku koja može mijenjati svoju duljinu.

Model centriranja putem toka mikrotubula predlaže mehanizam u kojem sile nastale djelovanjem motornih proteina i *crosslinkera* u područjima preklopa kinetohornih i premosnih mikrotubula guraju kinetohore (a time i kromosome) prema centralnoj ravnini diobenog vretena. Budući da su motorni proteini i *crosslinkeri* homogeno raspodijeljeni duž preklopa mikrotubula, sila će ovisiti o duljini preklopa premosnih i kinetohornih mikrotubula, ali i o



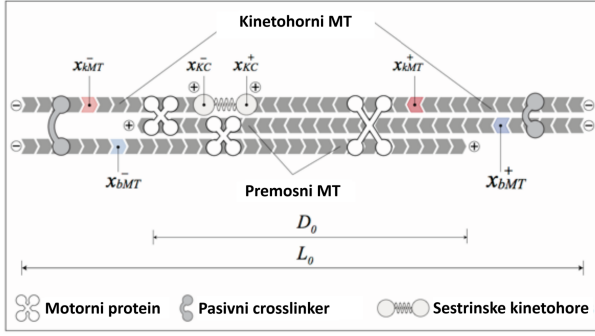
Slika 11: Ilustracija teorijskog modela diobenog vretena temeljenog na silama nastalim zbog polarnog toka premosnih i kinetohornih mikrotubula. Prilagođeno iz [14].

razlici brzina njihovog toka [14].

Pogledajmo prije uvođenja jednadžbi kvalitativan opis dinamike ovakvog sustava. Kad su kinetohore izmaknute iz središta, dulji kinetohorni mikrotubul brže teče zbog duljeg antiparalelnog preklopa s premosnim mikrotubulom sa suprotnog pola, što omogućava vezanje većeg broja motornih proteina između njih. Osim toga, paralelni preklop duljeg mikrotubula s kinetohornim mikrotubulom je veći što dozvoljava vezanje većeg broja pasivnih *crosslinkera*. Premosni mikrotubuli brže teku prema polovima te zato „povlače” paralelni kinetohorni mikrotubul za sobom prema polu [14].

3.2 Definiranje modela

Teorijski model sustava sastoji se od dvije sestrinske kinetohore, dva antiparalelna kinetohorna mikrotubula i dva premosna mikrotubula (slika 12). Postavljamo koordinatni sustav tako da je ishodište na sredini diobenog vretena. Položaje kinetohora označavamo s x_{KC}^{\pm} , položaj proizvoljnog elementa na kinetohornom mikrotubulu s x_{kMT}^{\pm} , a položaj nasumičnog elementa na premosnom mikrotubulu s x_{pMT}^{\pm} . Pripadne brzine su označene s v_{KC}^{\pm} , v_{kMT}^{\pm} i v_{pMT}^{\pm} (slika 12). Oznake „+” i „-” odnose se redom na desnu odnosno lijevu stranu modela. Ukupna duljina diobenog vretena je L_0 , a ukupna duljina antiparalelnog preklopa premosnih mikrotubula je D_0 . Premosni mikrotubuli su jednake duljine s obje strane modela [14]. Duljine antiparalelnih preklopa



Slika 12: Shema pojednostavljenog teorijskog modela diobenog vretena. Sile nastaju djelovanjem motornih proteina u antiparalelnim preklopima premosnih i kinetohornih mikrotubula te *crosslinkera* na područjima s paralelnim preklopom. Usmjerenost mikrotubula sugeriraju podjedinice u obliku strelica. Prilagođeno iz [14].

kinetohornih i premosnih mikrotubula su

$$D^{\pm} = (D_0/2 \mp x_{KC}^{\pm}) \theta(D_0/2 \mp x_{KC}^{\pm}) \quad (1)$$

gdje je $\theta(x)$ Heavisideova step funkcija koja vodi računa o tome da D^{\pm} ne postanu negativni kad preklopa nema već ostanu nula. Za paralelne preklope vrijedi

$$L^{\pm} = L_0/2 \mp x_{KC}^{\pm} \quad (2)$$

gdje je L_0 je ukupna duljina diobenog vretena.

Ovaj sustav nalazi se u režimu vrlo malih Reynoldsovih brojeva pa su jednadžbe koje opisuju sustav u režimu natkritičnog gušenja. Zbog toga inercijski član u Newtonovoj jednadžbi gibanja zanemarujemo te se Newtonova jednadžba formalno pretvara u jednadžbu ravnoteže sila [11].

Sile motora i *crosslinkera* u (anti)paralelnim preklopima dane su kao

$$F_m^{\pm} = n_m D^{\pm} f_m^{\pm} \quad (3)$$

$$F_c^{\pm} = n_c L^{\pm} f_c^{\pm} \quad (4)$$

gdje su n_m i n_c linearne gustoće motornih odnosno *crosslinking* proteina. f_m je sila jednog motora na desni (+) odnosno lijevi (-) kinetohorni mikrotubul

$$f_m^{\pm} = f_0 \left[\pm 1 - \frac{v_{kMT}^{\pm} - v_{bMT}^{\mp}}{v_0} \right] \quad (5)$$

gdje je f_0 zaustavna sila („*stall force*”), a v_0 brzina motora bez tereta. f_c je sila jednog pasivnog *crosslinkera* na desni (+) odnosno lijevi (-) premosni mikrotubul

$$f_c^{\pm} = \mu_c (v_{kMT}^{\pm} - v_{bMT}^{\pm}) \quad (6)$$

gdje je μ_c efektivni koeficijent trenja *crosslinkera*.

Sila jednog motornog proteina izračunata je iz poznate *force-velocity* relacije za kinetohore [1].

Kretanje kinetohora određeno je silama koje na njih djeluju. Sila kojom pripadni kinetohorni mikrotubul djeluje na kinetohoru modelirana je kao

$$F_{KC}^{\pm} = -\mu_{KC} (v_{KC}^{\pm} - v_{kMT}^{\pm}) \quad (7)$$

gdje je μ_{KC} efektivni koeficijent trenja između kinetohore i mikrotubula. Kako su ovo jedine sile koje djeluju na kinetohoru u modelu, one se moraju izjednačiti:

$$F_{KC}^+ = +F_{el} \quad (8a)$$

$$F_{KC}^- = -F_{el} \quad (8b)$$

Elastična veza sestrinskih kinetohora modelirana je Hookeovim zakonom

$$F_{el} = k (x_{KC}^+ - x_{KC}^- - x_0) \quad (9)$$

gdje je x_0 ravnotežna udaljenost među kinetohorama, a k efektivna konstanta „opruge” među kinetohorama.

Dinamiku kinetohornih mikrotubula pokreću sile motora u antiparalelnom preklopu premosnih i kinetohornih mikrotubula, a njima su suprotstavljene sila *crosslinkera* i sila na kinetohorama. Ravnoteža sila na kinetohornim mikrotubulima na desnom i lijevom kraju glasi

$$F_m^+ - F_c^+ - F_{KC}^+ = 0 \quad (10a)$$

$$F_m^- - F_c^- - F_{KC}^- = 0 \quad (10b)$$

gdje je F_m^{\pm} sila motornih proteina na lijevi (-) odnosno desni (+) kinetohorni mikrotubul, F_c^{\pm} je sila *crosslinkera* na lijevi (-) odnosno desni (+) premosni mikrotubul, a F_{KC}^{\pm} je već ranije definirana sila kinetohornih mikrotubula na lijevu (-) odnosno desnu (+) kinetohoru.

Premosne mikrotubule pogoni sila motora u njihovom međusobnom antiparalelnom preklopu

$$F_{bMT} = n_m D_0 f_0 \left(1 - \frac{v_{bMT}^+ - v_{bMT}^-}{v_0} \right) \quad (11)$$

$n_m D_0$ daje ukupan broj motora u antiparalelnom preklopu premosnih mikrotubula. Ovako definirana, F_{bMT} daje silu motornih proteina u antiparalelnom preklopu premosnih mikrotubula na „+” premosni mikrotubul.

Sili F_{bMT} suprotstavljaju se sila motora u antiparalelnom preklopu kinetohornih i premosnih mikrotubula i sila „trenja” *crosslinkera* u paralelnom preklopu premosnih i kinetohornih mikrotubula. Uz prethodne definicije sila F_m i F_c , jednadžbe ravnoteže sila na premosnim mikrotubulima glase

$$F_{bMT} - F_m^- + F_c^+ = 0 \quad (12a)$$

$$F_{bMT} + F_m^+ - F_c^- = 0 \quad (12b)$$

3.3 Aproksimacije

Kako bismo pojednostavili rješavanje modela uvdimo dvije aproksimacije koje uglavnom vrijede u diobenom vretenu [14]. To su zanemarivanje razlika brzina kinetohora i fiksiranje brzine toka premosnih mikrotubula.

3.3.1 Zanemarivanje razlike brzina kinetohora

Želimo pokazati da približno vrijedi sljedeća jednakost:

$$\Delta v_{\text{KC}} \equiv v_{\text{KC}}^+ - v_{\text{KC}}^- = 0 \quad (13)$$

Uvodimo najprije vremensku skalu $t_c = D_0/(v_{\text{KC}}^+ + v_{\text{KC}}^-)$ kao relevantnu za centriranje kinetohora. Na toj skali relativna brzina kinetohora ima približnu vrijednost [14]

$$\Delta v_{\text{KC}} \approx (x_{\text{KC}}^+ - x_{\text{KC}}^-)/t_c \quad (14)$$

Zbrajanjem jednadžbi (8a) i (8b) dobivamo izraz

$$x_{\text{KC}}^+ - x_{\text{KC}}^- = -\frac{\mu_{\text{KC}}}{2kD_0} (v_{\text{KC}}^+ - v_{\text{KC}}^- + v_{\text{kMT}}^- - v_{\text{kMT}}^+) + \frac{x_0}{D_0} \quad (15)$$

Uvrštavanjem izraza za t_c i jednadžbe (15) u jednadžbu (14) te zanemarivanjem faktora x_0/D_0 (jer je udaljenost kinetohora mnogo manja od preklopa premosnih mikrotubula) dobiva se sljedeći izraz

$$\frac{\Delta v_{\text{KC}}}{v_{\text{KC}}^+ + v_{\text{KC}}^-} = \frac{\frac{\mu_{\text{KC}} v_0}{2kD_0}}{\left[1 + \frac{\mu_{\text{KC}}}{2kD_0} (v_{\text{KC}}^+ + v_{\text{KC}}^-)\right]} \quad (16)$$

Za tipične parametre $k = 100 \text{ pN}/\mu\text{m}$, $D_0 = 6 \mu\text{m}$, $\mu_{\text{KC}} = 30 \text{ pNmin}/\mu\text{m}$ i $v_0 = 4 \mu\text{m}/\text{min}$ [14] desna strana jednakosti je puno manja od 1, pa aproksimacija (13) slijedi.

3.3.2 Približna vrijednost brzine toka premosnih mikrotubula

Iako je model moguće riješiti i bez sljedeće aproksimacije, račun je daleko i nepotrebno složeniji. Želimo stoga opravdati aproksimaciju:

$$v_{\text{bMT}}^\pm = \pm \frac{v_0}{2} \quad (17)$$

Iz jednadžbe (11) se jednostavnim ali poduljim raspisom za kinetohore u centralnom položaju ($D^+ = D^-$ i $L^+ = L^-$) može izvesti izraz

$$\begin{aligned} \frac{2v_{\text{bMT}}^+}{v_0} \left(1 + \frac{n_c L^+ \mu_c}{n_m D_0 f_0} \frac{v_0}{2} + \frac{D^+}{2D_0}\right) &= \\ = 1 + \frac{n_c L^+ \mu_c}{n_m D_0 f_0} v_{\text{kMT}}^+ + \frac{D^+}{D_0} \left(1 + \frac{v_{\text{kMT}}^-}{v_0}\right) & \quad (18) \end{aligned}$$

Ako je utjecaj motornih proteina značajno veći nego onaj *crosslinkera*, vrijedi $n_c L^+ \mu_c v_0 \ll n_m D_0 f_0$ i drugi članovi s obje strane jednakosti se mogu zanemariti. Nadalje, kako je antiparalelni preklop kinetohornih i premosnih mikrotubula znatno manji od antiparalelnog preklopa premosnih mikrotubula, vrijedi $D^+ \ll D_0$ pa se i treći članovi s obje strane jednakosti mogu zanemariti. Imamo dakle na kraju

$$\frac{2v_{\text{bMT}}^+}{v_0} = 1 \quad (19)$$

čime je opravdana i druga aproksimacija [14].

3.4 Brzine kinetohora i kinetohornih mikrotubula

Korištenjem navedenih aproksimacija i uvrštavanjem relevantnih sila u jednadžbe (10) dolazimo do izraza za brzine kinetohornih mikrotubula:

$$v_{\text{kMT}}^\pm = \alpha^\pm \left(\mu_{\text{KC}} v_{\text{KC}} \pm \frac{v_0}{2} (g_c^\pm + g_m^\pm) \right) \quad (20)$$

gdje su definirane pokrate

$$\begin{aligned} \alpha^\pm &\equiv (n_c L_c^\pm \mu_c + n_m D^\pm f_0 / v_0 + \mu_{\text{KC}})^{-1} \\ g_c^\pm &\equiv n_c L_c^\pm \mu_c \\ g_m^\pm &\equiv n_m D^\pm f_0 / v_0 \end{aligned}$$

U konačnici se dobiva izraz za brzine kinetohora

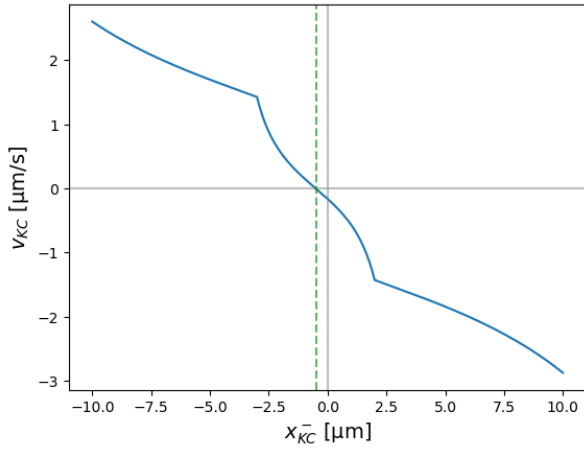
$$\begin{aligned} v_{\text{KC}} = \frac{v_0}{2\mu_{\text{KC}}} \left[\frac{(g_c^+ + g_m^+) (1 - \alpha^+ (g_c^+ + g_m^+))}{\alpha^+ (g_c^+ + g_m^+) + \alpha^- (g_c^- + g_m^-)} \right. \\ \left. - \frac{(g_c^- + g_m^-) (1 - \alpha^- (g_c^- + g_m^-))}{\alpha^+ (g_c^+ + g_m^+) + \alpha^- (g_c^- + g_m^-)} \right] \quad (21) \end{aligned}$$

Ovisnost brzine lijeve kinetohore o njenom položaju nacrtana je na slici 13.

Jednadžba (21) eksplicitno ovisi samo o geometriji sustava pa ju je moguće riješiti integriranjem u vremenu. Ovisnost o vremenu je implicitna - pojavljuje se kao ovisnost brzine kinetohora o njihovom položaju, a on pak ovisi o vremenu.

4 Rješenje modela

Jednadžba (21) je numerički integrirana metodom konačnih razlika. Kod za integraciju napisan je u Pythonu, a dostupan je na [GitHub repozitoriju](#) [12]. Rješenje modela je najprije izračunato za odabir parametara kao u [14], a zatim su linearne gustoće motornih proteina i *crosslinkera* mijenjane kako bi se proučio njihov utjecaj na model. Ti su parametri odabrani jer su najmanje pouzdani u modelu, dok je vrijednost ostalih parametara poznata s većom sigurnošću.



Slika 13: Ovisnost brzine lijeve kinetohore o njenom položaju. Zelena iscrtkana linija označava položaj $x = -d/2$. Diskontinuitet u prvom derivaciji nastaje kad se kinetohora izmakne tako da nestane antiparalelni preklap kinetohornog i prenosnog mikrotubula s jedne strane. Parametri modela navedeni su u tablici 1.

Parametar	Vrijednost
v_0	$4 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$
f_0	5 pN
μ_{KC}	$30 \text{ pN} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{m}^{-1}$
μ_c	$1 \text{ pN} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{m}^{-1}$
n_c	$1 \mu\text{m}^{-1}$
n_m	$10 \mu\text{m}^{-1}$
d	$1 \mu\text{m}$
L_0	$14 \mu\text{m}$
D_0	$6 \mu\text{m}$

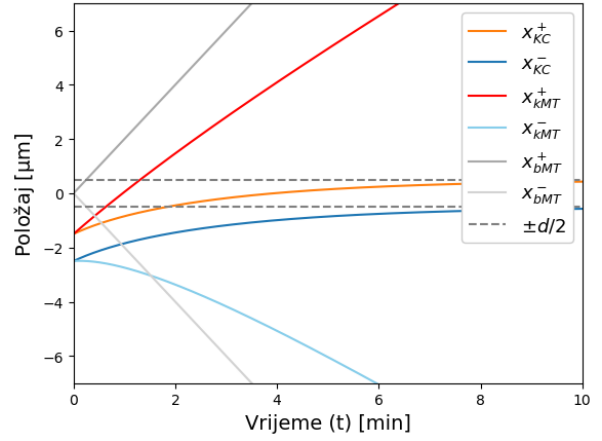
Tablica 1: Parametri modela korišteni za numerički račun u poglavlju 4.1 (preuzeti iz [14]).

4.1 Rezultat za jedan odabir parametara

Parametri su odabrani kao u [14] (vidi tablicu 1). Izračunati su položaji i brzine kinetohora i mikrotubula te je provjerena konzistentnost rezultata s jednadžbama ravnoteže sila.

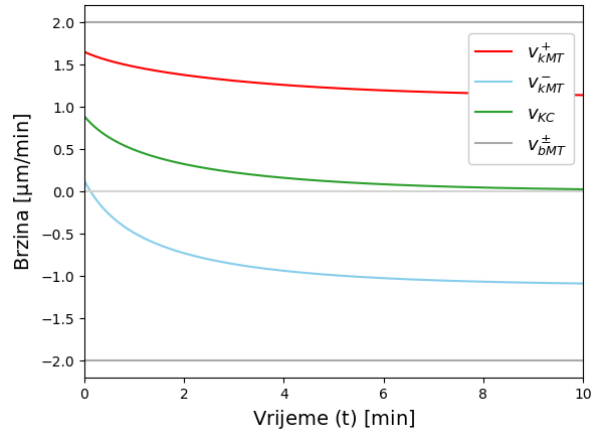
Položaji kinetohora, podjedinica kinetohornih mikrotubula te podjedinica prenosnih mikrotubula prikazani su na slici 14. Početni odmak lijeve kinetohore od ishodišta je $x_{KC}^-(t=0) = -2.5 \mu\text{m}$. Odabrane su podjedinice na kinetohornim mikrotubulima koje su u početnom trenutku ($t=0$) na istom položaju kao pripadne kinetohore te podjedinice na prenosnim mikrotubulima koje su u početku na položaju $x_{bMT}^\pm(t=0) = 0$.

Na grafu se uočava približavanje sestrinskih ki-



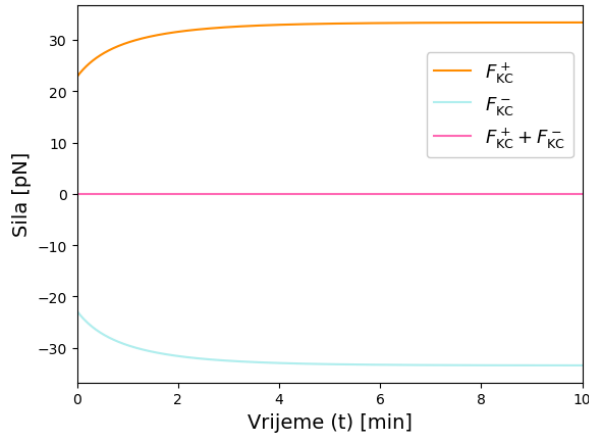
Slika 14: Graf ovisnosti položaja mikrotubula i kinetohora o vremenu. Toplije boje označavaju desnu (+), a hladnije lijevu (-) stranu modela. Početni odmak lijeve kinetohore je $-2.5 \mu\text{m}$. Parametri su dani u tablici 1.

netohora (narančasta i plava linija) njihovim ravnotežnim položajima (iscrtkane sive linije na $\pm d/2$), dakle model uspješno reproducira centriranje kinetohora za ovakav odabir parametara. Desni kinetohorni mikrotubul ima tok udesno, u početku brzinom gotovo istom kao i desni prenosni mikrotubul, a kasnije mu brzina opada kako se kinetohore centriraju. Brzina toka lijevog kinetohornog mikrotubula je u početku blizu nule, a kako se kinetohore centriraju pomiče se prema negativnim vrijednostima (lijevi mikrotubul teče u lijevo).



Slika 15: Ovisnost brzine kinetohora, kinetohornih mikrotubula i prenosnih mikrotubula o vremenu. Parametri dani u tablici 1.

Na slici 15 prikazane su brzine kinetohora i mikrotubula čiji su položaji nacrtani u slici 14. Vidljivo je da tok kinetohornih mikrotubula teži konstantnoj vrijednosti različitoj od nule čak i kad su kinetohore



Slika 16: Ravnoteža sila na kinetohorama. Zbroj sila je jednak nuli (roza linija) što je konzistentno s jednažbama (8). Parametri iz tablice 1.

centrirane. Vrijednosti brzine toka kinetohornih i prenosnih mikrotubula usporedive su s onima izmjerenima u [14].

Kao provjera konzistentnosti rezultata izračunate su i nacrtane jednažbe ravnoteže sila (8), (10) i (12). Ravnoteža sila na kinetohorama prikazana je na slici 16, za kinetohorne mikrotubule na slici 17, a za prenosne mikrotubule na slici 18.

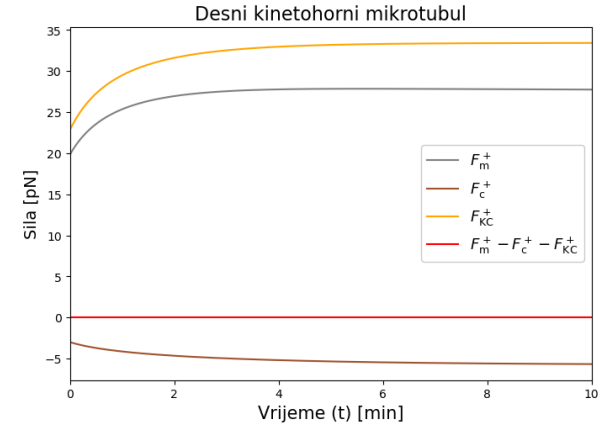
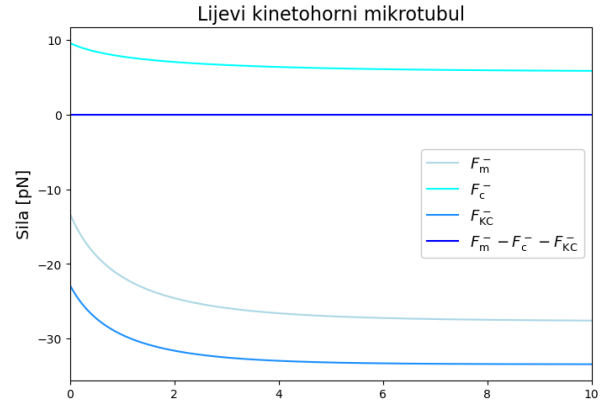
Na slici 12 je iskorištena aproksimacija (17) pa je u jednažbama (12) $F_{\text{BMT}} = 0$. Izjednačene su lijeve strane jednažbi (12a) i (12b). Vidljivo je slaganje linija za obje jednažbe, dakle rezultat je konzistentan sa zahtjevom ravnoteže sila.

4.2 Istraživanje prostora parametara

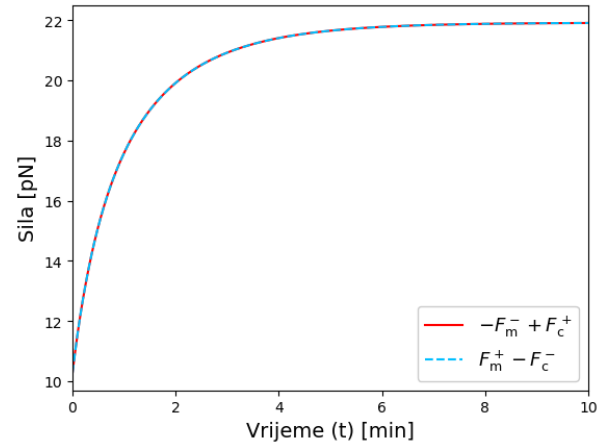
Kako bi se provjerio utjecaj gustoće motornih proteina i *crosslinkera* na centriranje kinetohora, parametri n_m i n_c su varirani u rasponu od $0.1 \mu\text{m}^{-1}$ do $100 \mu\text{m}^{-1}$. Ostali parametri su kao u tablici 1. Proveden je isti račun kao u potpoglavlju 4.1, a rezultati su prikazani na slikama 21 i 22 (zbog broja grafova slike su smještene na zasebnim stranicama na kraju teksta).

Povećanje koncentracije *crosslinkera* snažno potiskuje centriranje kinetohora. Uzrok tome je povećanje brzine toka kinetohornih mikrotubula koja postaje bliža brzini toka prenosnih mikrotubula što vodi do slabijeg centriranja.

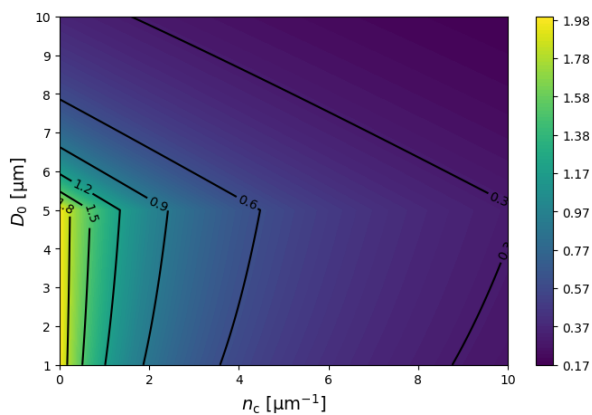
Koncentracija motora ima optimalnu vrijednost ispod $20 \mu\text{m}/\text{min}$ [14]. Ispod te vrijednosti sila *crosslinkera* postaje dominantna, a ona ne centrira kinetohore toliko dobro, dok iznad te vrijednosti tok kinetohornih mikrotubula opet postaje prevelik čime se smanjuje razlika toka prenosnih i kinetohornih mikrotubula što vodi slabijem centriranju.



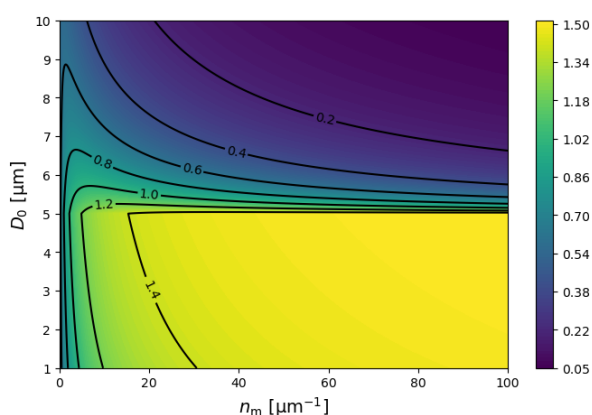
Slika 17: Ravnoteža sila na kinetohornim mikrotubulima. Gornji graf (hladne boje) prikazuje lijevi kinetohorni mikrotubul, a donji graf (tople boje) desni kinetohorni mikrotubul. Oba grafa pokazuju konzistentnost s jednažbama (10). Parametri u tablici 1.



Slika 18: Ravnoteža sila na prenosnim mikrotubulima. Uračunata je aproksimacija (17). Preklapanje plave iscrkane i crvene pune linije pokazuje konzistentnost računa. Parametri iz tablice 1.



Slika 19: Početna brzina centriranja u ovisnosti o koncentraciji *crosslinkera* i duljini antiparalelnog preklopa prenosnih mikrotubula D_0 . Ostali parametri su kao u tablici 1.



Slika 20: Početna brzina centriranja u ovisnosti o koncentraciji motornih proteina n_m i duljini antiparalelnog preklopa prenosnih mikrotubula D_0 . Ostali parametri su kao u tablici 1.

Dodatno je istražena i ovisnost početne brzine centriranja o koncentraciji motora odnosno *crosslinkera* i duljini antiparalelnog preklopa prenosnih mikrotubula D_0 .

Povećanjem koncentracije *crosslinkera* brzina centriranja opada. Za niske koncentracije *crosslinkera* brzina je stabilna do duljine preklopa od oko $5 \mu\text{m}$ nakon čega brzo trne (slika 19).

Konačno, ovisnost početne brzine centriranja o gustoći motora i antiparalelnom preklopu prenosnih mikrotubula prikazana je na slici 20. Vidimo dva režima: za kraće preklope centriranje je brzo, a za D_0 veće od otprilike $5 \mu\text{m}$ brzina centriranja naglo opada. Razlog tome je što kraći kinetohorni mikrotubul za manje D_0 gubi kontakt s antiparalelnim prenosnim mikrotubulom pa s te strane nestaje sila motora koja se opire centriranju [14].

5 Zaključak

U ovome seminaru prezentiran je teorijski model centriranja kinetohora u diobenom vretenu temeljen na silama koje generiraju motorni proteini u antiparalelnom preklopu prenosnih mikrotubula i antiparalelnom preklopu prenosnih i kinetohornih mikrotubula. Model uključuje bitne faktore diobenog vretena poznate iz eksperimenata u pojednostavljenoj slici. Sustav je tada moguće kvantitativno analizirati, što je napravljeno numeričkim rješavanjem jednadžbi sustava u Pythonu. Rješenja reproduciraju centriranje za tipične parametre fizikalnih veličina u stanici. Variranjem odabranih parametara istražene su granice stabilnosti sustava, a istovremeno je ispitana robusnost modela.

Izloženi model je još uvijek relativno nov i potrebno ga je podložiti detaljnijim eksperimentalnim provjerama. Nadalje, u model je ugrađena samo dinamika plus krajeva mikrotubula, dok su minus krajevi fiksirani „rukom”. Budući teorijski radovi mogli bi proširiti model tako da sadrži i dinamiku minus krajeva.

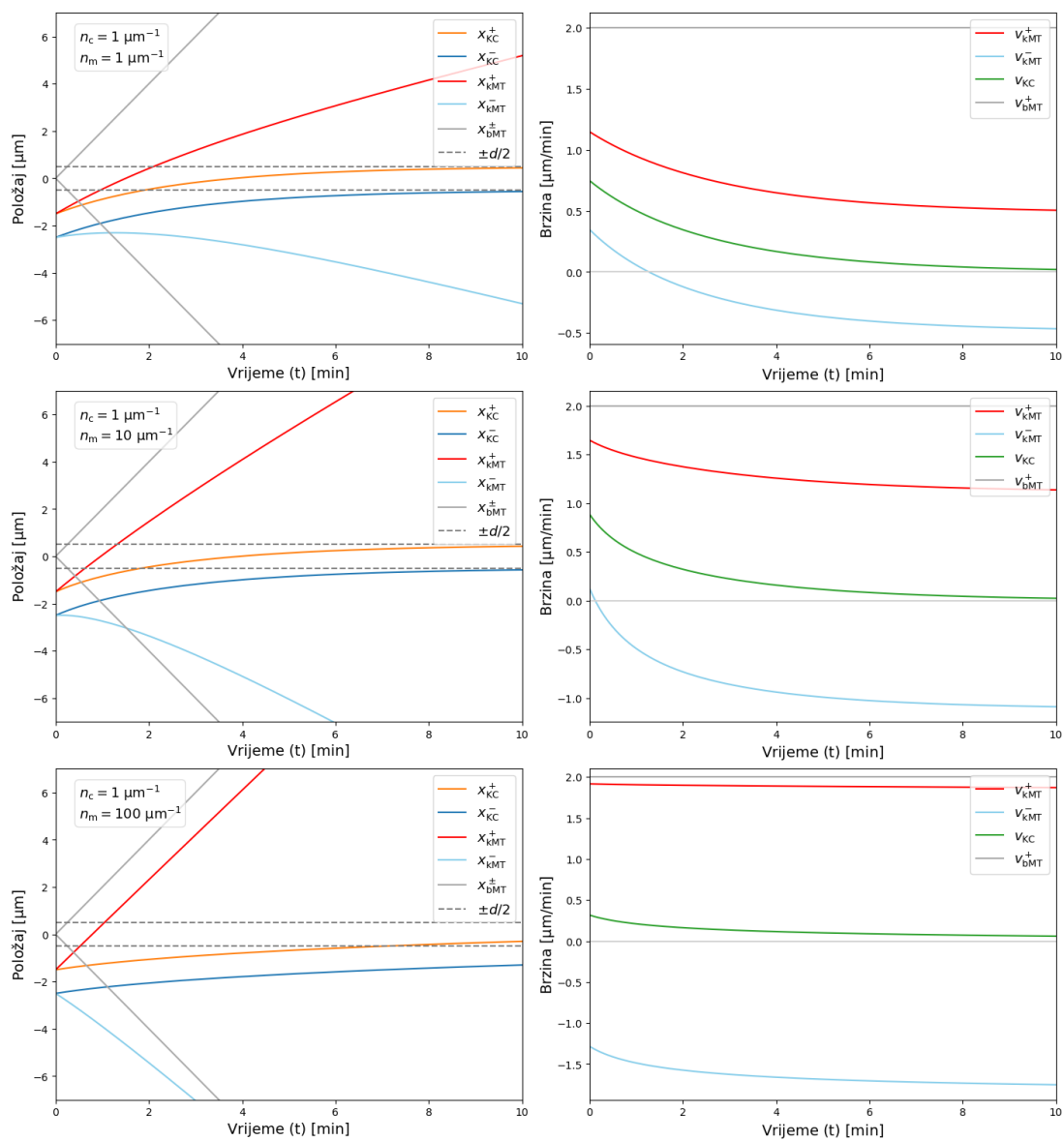
6 Zahvale

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Nenadu Pavinu na uloženom vremenu, trudu i strpljenju tijekom izrade ovog seminara. Njegovi komentari i sugestije bili su mi od velike pomoći.

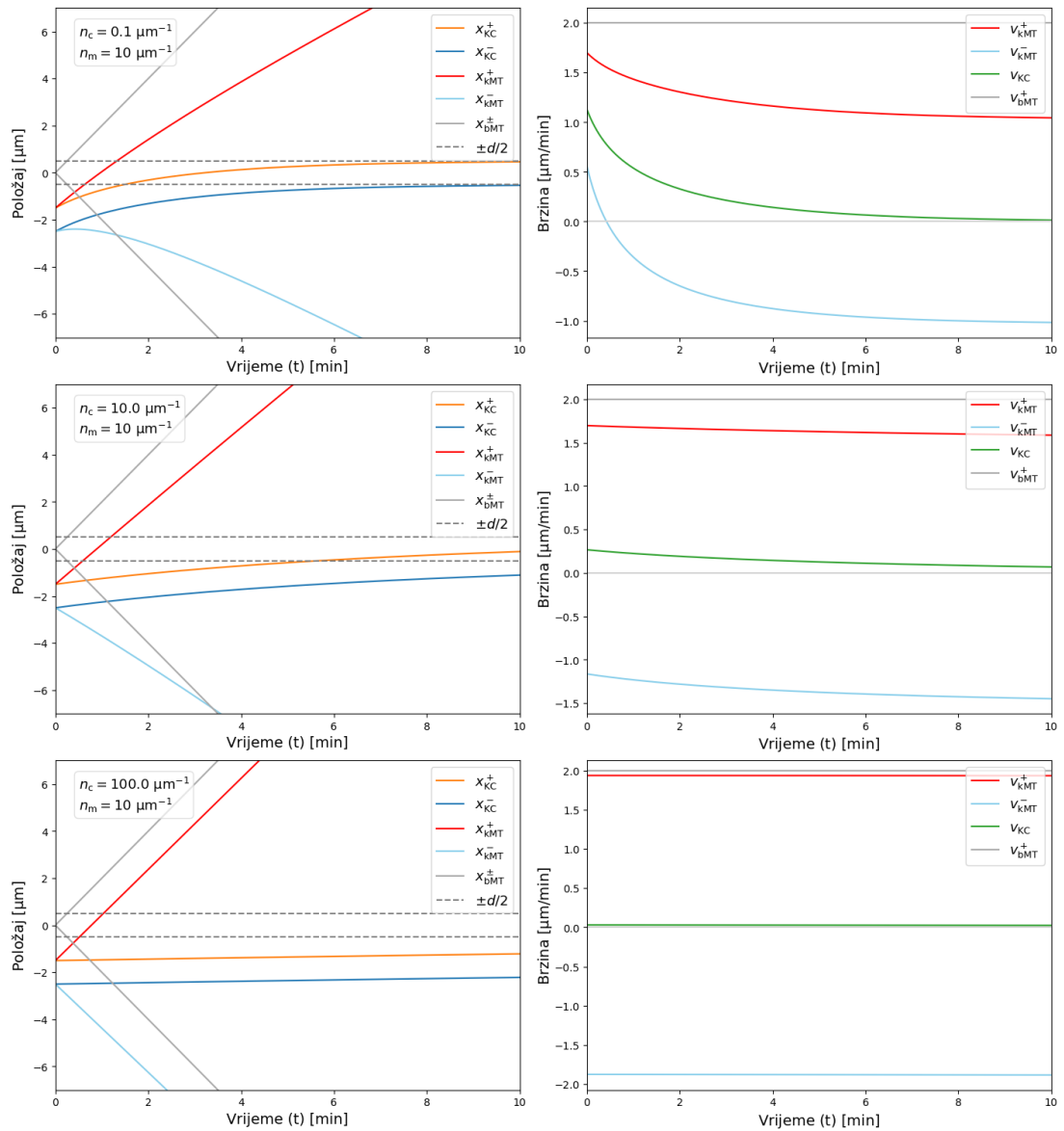
Literatura

- [1] Bungo Akiyoshi i dr. „Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments”. *Nature* 468.7323 (2010.), str. 576–579.
- [2] B. Alberts i dr. *Molecular Biology of the Cell*. 500 Tips. Garland Science, 2014. ISBN: 9780815344322. URL: https://books.google.hr/books?id=_NkpygAACAAJ.
- [3] N.A. Campbell i dr. *Biology: A Global Approach, Global Edition*. Global Edition / English textbooks. Pearson, 2020. ISBN: 9781292341699. URL: <https://books.google.hr/books?id=ZcAoEAAAQBAJ>.
- [4] G.M. Cooper. *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Series. Oxford University Press, Incorporated, 2019. ISBN: 9781605358635. URL: <https://books.google.hr/books?id=4718wQEACAAJ>.

- [5] Arne Gennerich i Ronald D Vale. „Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps”. *Current Opinion in Cell Biology* 21.1 (2009.). Cell structure and dynamics, str. 59–67. ISSN: 0955-0674. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.002>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506740800197X>.
- [6] J. Howard. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Publishers, 2001. ISBN: 9780878933341. URL: <https://books.google.hr/books?id=-mmnQgAACAAJ>.
- [7] Mihaela Jagrić i dr. „Optogenetic control of PRC1 reveals its role in chromosome alignment on the spindle by overlap length-dependent forces”. *eLife* 10 (siječanj 2021.). Ur. Anna Akhmanova i Julie PI Welburn, e61170. ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.61170](https://doi.org/10.7554/eLife.61170). URL: <https://doi.org/10.7554/eLife.61170>.
- [8] Helder Maiato i dr. „Mechanisms of chromosome congression during mitosis”. *Biology* 6.1 (2017.), str. 13. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology6010013>.
- [9] T J Mitchison. „Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence.” *Journal of Cell Biology* 109.2 (kolovoz 1989.), str. 637–652. ISSN: 0021-9525. DOI: [10.1083/jcb.109.2.637](https://doi.org/10.1083/jcb.109.2.637). eprint: <https://rupress.org/jcb/article-pdf/109/2/637/1466523/637.pdf>. URL: <https://doi.org/10.1083/jcb.109.2.637>.
- [10] Nenad Pavin i Iva M. Tolić. „Mechanobiology of the Mitotic Spindle”. *Developmental Cell* 56.2 (2021.), str. 192–201. ISSN: 1534-5807. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.003>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580720308789>.
- [11] R. Phillips i dr. *Physical Biology of the Cell*. Garland Science, 2013. ISBN: 9780815344506. URL: <https://books.google.hr/books?id=JnyPZwEACAAJ>.
- [12] Denis Radolović. *SSIF numerical solution*. URL: <https://github.com/E7hernal/SSIF>.
- [13] Patrik Risteski i dr. „Biomechanics of chromosome alignment at the spindle midplane”. *Current Biology* 31.10 (2021.), R574–R585. ISSN: 0960-9822. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.082>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982221004553>.
- [14] Patrik Risteski i dr. „Length-dependent poleward flux of sister kinetochore fibers promotes chromosome alignment”. *Cell Reports* 40.5 (2022.), str. 111169. ISSN: 2211-1247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111169>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124722009822>.
- [15] Anthony J Roberts i dr. „Functions and mechanics of dynein motor proteins”. *Nature reviews Molecular cell biology* 14.11 (2013.), str. 713–726.
- [16] Ronald D. Vale i Ronald A. Milligan. „The Way Things Move: Looking Under the Hood of Molecular Motor Proteins”. *Science* 288.5463 (2000.), str. 88–95. DOI: [10.1126/science.288.5463.88](https://doi.org/10.1126/science.288.5463.88). eprint: <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.288.5463.88>. URL: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.288.5463.88>.
- [17] Kruno Vukušić i dr. „Microtubule Sliding within the Bridging Fiber Pushes Kinetochore Fibers Apart to Segregate Chromosomes”. *Developmental Cell* 43.1 (2017.), 11–23.e6. ISSN: 1534-5807. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.010>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580717307335>.



Slika 21: Položaj i brzina kinetohora i mikrotubula za koncentraciju *crosslinkera* $n_c = 1 \mu\text{m}^{-1}$ i različite koncentracije motornih proteina n_m . Lijevi stupac prikazuje položaj, a desni brzinu kinetohora, kinetohornih i prenosnih mikrotubula o vremenu. Tople boje označavaju desnu, a hladne lijevu stranu modela. Uočljivo je da za visoku koncentraciju motornih proteina (treći red) centriranje postaje vrlo usporeno.



Slika 22: Položaj i brzina kinetohora, kinetohornih i prenosnih mikrotubula uz konstantnu koncentraciju motora $n_m = 10 \mu\text{m}^{-1}$ i različite koncentracije *crosslinkera* n_c . Lijevi stupac prikazuje položaj, a desni brzinu kinetohora, kinetohornih i prenosnih mikrotubula o vremenu. Tople boje označavaju desnu, a hladne lijevu stranu modela. Za visoku koncentraciju *crosslinkera* (iznad $10 \mu\text{m}^{-1}$) centriranje kinetohora je jako sporo, odnosno do njega praktički ne dolazi.