

Proučavanje ravnoteže sila i momenata u diobenom vretenu u aproksimaciji srednjeg polja

Arian Ivec

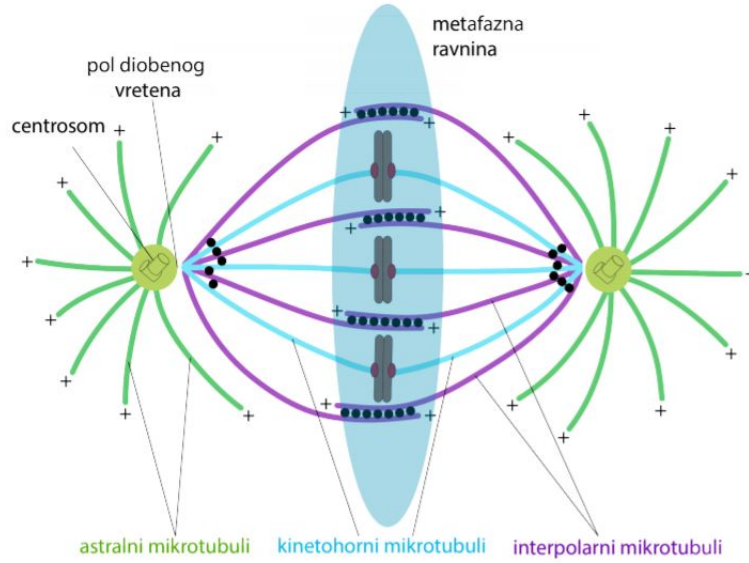
21. siječnja 2018.

Sažetak

Prilikom stanične diobe, stanica formira diobeno vreteno, konstrukciju koja služi preciznom razdvajanju dvije kopije genetskog materijala stanice majke u dvije stanice kćeri. Istraživačka grupa izv. prof. dr. sc. Pavina razvila je teorijski model koji opisuje statičku ravnotežu diobenog vretena u metafaznom djelu diobe. Cilj ovog seminara bio je reproducirati te rezultate i potom ih proširiti na veći broj modeliranih mikrotubula prelaskom na kontinuiranu aproksimaciju srednjeg polja.

1 Uvod

Stanična dioba, proces djeljenja stanice majke na dvije stanice kćeri, je fundamentalan za život. Za njeno uspješno izvođenje potrebno je precizno razdijeliti genetski materijal stanice, što ona čini formiranjem diobenog vretena. Diobeno vreteno je kompleksna struktura sastavljena od mikrotubula, proteinskih filamenata tubulina, i kromosoma, nosioca genetskog materijala, te raznih pomoćnih proteina. Diobeno vreteno nastaje uslijed samoorganizacije [1] mikrotubula i kromosoma, čija je dinamika rezultat precizno reguliranih sila i momenata u vremenu i prostoru, prouzrokovane molekularnim motorima [2], ali i samom (de)polimerizacijom mikrotubula [3]. Izgled vretena u metafazi, jednoj od četiri faze diobe [4], kada vreteno posjeduje najveći stupanj simetrije, prikazan je na slici 1. Mikrotubuli su jednim krajem pričvršćeni na centrosome, dok drugim u prostoru traže kromosome, kako bi se zaljepili za njihove kinetohore [8]. Nakon što su kinetohore uhvaćene mikrotubulima s oba centrosoma, te kinetohorne mikrotubule, koje su odgovorne za pozicioniranje kromosoma u sredinu metafazne ravnine, povezuju se prenosnim mikrotubulima [9]-[10], čineći time jedinstvenu strukturu. Zbog elastičnih svojstva mikrotubula [11] moguće je ove rezultatne kompozitne objekte promatrati kao kontinuirane elastične štapove koji ne međudjeluju [12]. Tijekom metafaze, diobeno vreteno je statički objekt [13], te je za određivanje oblika mikrotubula uslijed deformacije nastalom djelovanjem sila i momenata moguće primjeniti teoriju elastičnosti.



Slika 1: Prikaz diobenog vretena u metafazi. Detaljnije o mikrotubulima, njihovim svojstvima i podvrstama moguće je pročitati u [5]-[6] Prilagođeno iz [7].

2 Diskretni model ravnoteže

Model statičke ravnoteže diobenog vretena u metafazi razvijen od strane Pavin grupe [14] opisuje centrosome s čvrstima kuglama udaljenim za \vec{L} , dok su mikrotubuli, indeksirani sa $i = 1, \dots, n$, elastični štapovi čiji je položaj na površini centrosoma određen vektorima \vec{d}_i za lijevi, odnosno \vec{d}'_i za desni centrosom, primjećujući da je $|\vec{d}_i| = |\vec{d}'_i| = d$. Sustav je, za slučaj dva mikrotubula, prikazan na slici 2.

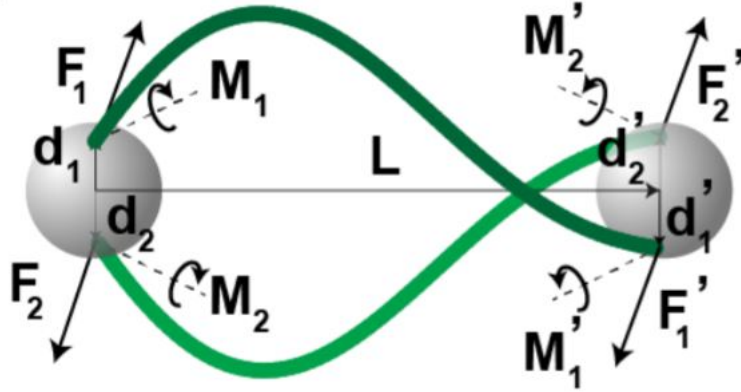
Na krajeve mikrotubula uslijed djelovanja molekularnih motora djeluju sile i momenti, koji potom daju oblik elastičnim mikrotubulima. Kako bi sustav bio u statičkoj ravnoteži, potrebno je da su sile i momenti na pojedinom centrosomu izjednačeni:

$$\sum_i^n \vec{F}_i = 0, \quad (1)$$

$$\sum_i^n (\vec{M}_i + \vec{d}_i \times \vec{F}_i) = 0. \quad (2)$$

Za desni centrosom vrijede analogne ' varijante :

$$\sum_i^n \vec{F}'_i = 0, \quad (3)$$



Slika 2: Skica modela s dva mikrotubula. Paralelni (\parallel) smjer i z-os koordinatnog sustava proteže se duž \vec{L} , dok je xy-ravnina okomita (\perp) na njega. Prilagođeno iz [14].

$$\sum_i^n (\vec{M}'_i + \vec{d}'_i \times \vec{F}'_i) = 0. \quad (4)$$

Nadalje, pojedini mikrotubul mora imati uravnotežene sile i momente između svog lijevog i desnog kraja kako bi bio statičan:

$$\vec{F}_i + \vec{F}'_i = 0, \quad (5)$$

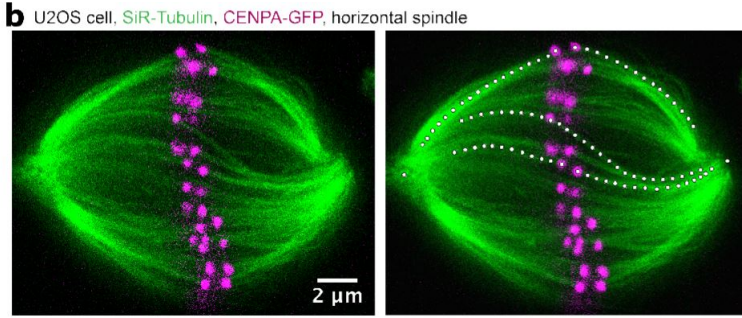
$$\vec{M}_i + \vec{M}'_i + \vec{d}_i \times \vec{F}_i + (\vec{d}'_i + \vec{L}) \times \vec{F}'_i = 0. \quad (6)$$

Ove jednadžbe ograničavaju moguće vrijednosti pojedinih \vec{F}_i , \vec{M}_i i \vec{d}_i . Mikrotubule modeliramo kao elastične štapove s fiksnim modulom elastičnosti κ i modulom torzije τ , čiji je oblik, uslijed deformacije nastale od sile i momenta na njihove krajeve, opisan duljinom s i radijalnim vektorom $\vec{r}(s)$, koji su povezani statičkom Kirchohoffom jednadžbom [15]:

$$\kappa \vec{t} \times \frac{d\vec{t}}{ds} + \tau \frac{d\phi}{ds} \vec{t} = \vec{r} \times \vec{F}_i - \vec{M}_i. \quad (7)$$

Ovaj model je riješen i daje točne predikcije za slučaj $n = 2$. One se dobiju tako da se oblik mikrotubula viđenim mikroskopijom u stanici usporedi s oblikom iz statičke Kirchoffove jednadžbe, te se tako dobiju sile i momenti, što se može vidjeti na slici 3. Ključno je napomenuti da je upravo dodavanje momenata, uz sile, iskorak koji omogućuje modelu da opiše uočene 3-D oblike mikrotubula.

Za potpuniji opis cjelokupnog vretena, a ne samo individualnih mikrotubula, potrebno bi bilo uzeti u obzir broj mikrotubula veći od dva. Kako bismo to pomirili s rješivošću modela, prelazimo na kontinuirani model, gdje su diskretni mikrotubuli, kao i sile i momenti na njih, zamijenjeni gustoćama.



Slika 3: Horizontalni presjek diobenog vretena u metafazi dobiven STED mikroskopijom. Iscrtkani oblik mikrotubula se traži kao rezultat statičke Kirchofove jednadžbe (7), da bi se odredile sile i momenti koji ga zadaju. Prilagođeno iz [7].

3 Model u aproksimaciji srednjeg polja

3.1 Početne pretpostavke

Za prelazak na kontinuum individualne mikrotubule zamjenjujemo sa kontinuiranim mikrotubulima čiji krajevi popunjavaju centrosome. Uvodimo koordinate θ i ϕ koje odgovaraju položaju krajevima mikrotubula na površini lijevog centrosoma, dok su na desnom $\theta'(\theta)$ i $\phi'(\phi)$, dajući time vezu između lijevog i desnog kraja mikrotubula. Individualne sile \vec{F}_i i momenti \vec{M}_i su zamjenjeni gustoćom sila $F(\vec{\theta}, \phi)$, odnosno gustoćom momenata $M(\vec{\theta}, \phi)$. Polazišna točka je opisani diskretni model statičke ravnoteže. Rastavljamo vektor gustoće na dva djela u odnosu na spojnicu centrosoma \vec{L} , njenu okomitu (xy-ravnina) i paralelnu (z-os):

$$\vec{F}(\theta, \phi) = \vec{F}^\perp(\theta, \phi) + \vec{F}^\parallel(\theta, \phi). \quad (8)$$

Želja je da sile i momenti budu simetrični s obzirom na rotaciju oko \vec{L} :

$$\vec{F}^\perp(\theta, \phi) = -\vec{F}^\perp(\theta, \phi + \pi), \quad (9)$$

$$\vec{F}^\parallel(\theta, \phi) = \vec{F}^\parallel(\theta, \phi + \pi), \quad (10)$$

$$|\vec{F}(\theta, \phi)| = |\vec{F}(\theta)|, \quad (11)$$

uz analogne jednadžbe za $\vec{M}(\theta, \phi)$. Ovo ograničava mogući izgled funkcija gustoće sila i momenata, te izbor koji zadovoljava nametnute simetrije jest:

$$\vec{F}(\theta, \phi) = f^\parallel(\theta)\hat{z} + f^\perp(\theta)(\cos(\phi + \delta)\hat{x} + \sin(\phi + \delta)\hat{y}), \quad (12)$$

$$\vec{M}(\theta, \phi) = m^\parallel(\theta)\hat{z} + m^\perp(\theta)(\cos(\phi + \delta)\hat{x} + \sin(\phi + \delta)\hat{y}), \quad (13)$$

gdje δ predstavlja moguću fazu na sile i momente na lijevom centrosomu.

3.2 Jednadžbe ravnoteže

Ekvivalenti jednadžbama (1) i (2) za lijevi centrosom, modificirane na kontinuirani oblik, glase:

$$\int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_0} \vec{F}(\theta, \phi) d\theta d\phi, \quad (14)$$

$$\int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_0} (\vec{M}(\theta, \phi) + \vec{d}(\theta, \phi) \times \vec{F}(\theta, \phi)) d\theta d\phi = 0. \quad (15)$$

Pritom je θ_0 kut, mjeren u odnosu na z-os, granični kut do kojega su centrosomi populirani krajevima mikrotubula, i on je nužno jednak za desni centrosom zbog želje da je sustav invarijantan na zamjenu lijevog i desnog centrosoma. Za \hat{x} i \hat{y} smjer, odnosno \perp smjer, ove jednadžbe su trivijalno zadovoljene. Duž \vec{L} pak imamo:

$$\hat{z} : \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_0} f^{\parallel}(\theta) d\theta d\phi = \int_0^{\theta_0} f^{\parallel}(\theta) d\theta = 0. \quad (16)$$

Ravnoteža lijevog i desnog kraja mikrotubula dana je sa jednadžbama:

$$\vec{F}(\theta, \phi) = -\vec{F}'(\theta', \phi'), \quad (17)$$

$$\vec{M}(\theta, \phi) + \vec{M}'(\theta', \phi') + \vec{d} \times \vec{F}(\theta, \phi) + (\vec{d}' + \vec{L}) \times \vec{F}'(\theta', \phi') = 0. \quad (18)$$

Raspis (17) po komponentama glasi:

$$\hat{x} : f^{\perp}(\theta) \cos(\phi + \delta) = -f^{\perp'}(\theta') \cos(\phi' + \delta'), \quad (19)$$

$$\hat{y} : f^{\perp}(\theta) \sin(\phi + \delta) = -f^{\perp'}(\theta') \sin(\phi' + \delta'), \quad (20)$$

$$\hat{z} : f^{\parallel}(\theta) = -f^{\parallel'}(\theta'), \quad (21)$$

dok je raspis (18) po komponentama nešto složeniji:

$$\begin{aligned} \hat{x} : & m^{\perp}(\theta) \cos(\phi + \delta) + m^{\perp'}(\theta') \cos(\phi' + \delta') + d(\sin(\theta) \sin(\phi + \delta) f^{\parallel} \\ & - \cos(\theta) \sin(\phi + \delta) f^{\perp}) + d'(\sin(\theta') \sin(\phi' + \delta') f^{\parallel'} \\ & - \cos(\theta') \sin(\phi' + \delta') f^{\perp'}) - f^{\perp'} L \sin(\phi' + \delta') = 0, \end{aligned} \quad (22)$$

$$\begin{aligned} \hat{y} : & m^{\perp}(\theta) \sin(\phi + \delta) + m^{\perp'}(\theta') \sin(\phi' + \delta') + d(\cos(\theta) \sin(\phi + \delta) f^{\perp} \\ & - \sin(\theta) \sin(\phi + \delta) f^{\parallel}) + d'(\cos(\theta') \sin(\phi' + \delta') f^{\perp'} \\ & - \sin(\theta') \sin(\phi' + \delta') f^{\parallel'}) + f^{\perp'} L \cos(\phi' + \delta') = 0, \end{aligned} \quad (23)$$

$$\hat{z} : m^{\parallel}(\theta) + m^{\parallel'}(\theta') = 0. \quad (24)$$

Tablica 1: Razvoj svih relevantnih funkcija u Taylorov red.

$f^\perp = f_0^\perp + f_1^\perp \theta + f_2^\perp \theta^2$
$f^\parallel = f_0^\parallel + f_1^\parallel \theta + f_2^\parallel \theta^2$
$m^\perp = m_0^\perp + m_1^\perp \theta + m_2^\perp \theta^2$
$m^\parallel = m_0^\parallel + m_1^\parallel \theta + m_2^\parallel \theta^2$
$f^{\perp'} = f_0^{\perp'} + f_1^{\perp'} \theta + f_2^{\perp'} \theta^2$
$f^{\parallel'} = f_0^{\parallel'} + f_1^{\parallel'} \theta + f_2^{\parallel'} \theta^2$
$m^{\perp'} = m_0^{\perp'} + m_1^{\perp'} \theta + m_2^{\perp'} \theta^2$
$m^{\parallel'} = m_0^{\parallel'} + m_1^{\parallel'} \theta + m_2^{\parallel'} \theta^2$
$\theta'(\theta) = \theta_0' + \theta_1' \theta + \theta_2' \theta^2$
$\phi'(\phi) = \phi_0' + \phi_1' \phi + \phi_2' \phi^2$
$\sin(\theta) = \theta$
$\cos(\theta) = 1 - \frac{\theta^2}{2}$

Iz (19) i (20) kvadriranjem i zbrajanjem slijedi

$$f^\perp(\theta) = \pm f^{\perp'}(\theta'), \quad (25)$$

što vodi do dvije moguće vrijednosti za ϕ

$$\phi_1' = \phi + (\delta - \delta'), \quad (26)$$

$$\phi_2' = \phi + \pi + (\delta - \delta'), \quad (27)$$

pri čemu ovaj izbor može ovisiti o θ .

3.2.1 Rješenje modela

Kako bismo riješili model razviti ćemo nepoznate skalarne funkcije f^\perp , f^\parallel , m^\perp , m^\parallel , i analogno $'$ verzije za desni centrosom, te $\theta'(\theta)$ i $\phi'(\phi)$ u Taylorov red, te su ti razvoji prikazani u tablici 3.2.1.

U daljnjim razmatranjima zadržati ćemo se samo na prva dva člana razvoja. Jednadžbe (14) i (15) iščezavaju u \perp smjeru, dok u \parallel smjeru dobivamo vezu između koeficijenata dva razvoja za f^\parallel i m^\parallel :

$$\frac{f_0}{f_1} = \frac{1 - \cos(\theta_0)}{\sin(\theta_0) - \cos(\theta_0)\theta_0} \quad (28)$$

i analogno za m^\parallel . Invarijantnost na zamjenu lijevog i desnog centrosoma fiksira koeficijente u razvoju θ' na $\theta' = +\theta$. Ponovno je jednadžbom (21) u \parallel smjeru desni centrosom zadan lijevim:

$$f^\parallel = f_0^\parallel + f_1^\parallel = -f^{\parallel'} = -(f_0^{\parallel'} + f_1^{\parallel'}), \quad (29)$$

imajući na umu da za $'$ funkcije vrijedi analogon (14). Iz (19) i (20) nakon razvoja ne zaključujemo ništa određenije nego prije. Iz preostale (22) i (23) nakon sređivanja dobivamo vezu između momenata u \perp smjeru:

$$m^\perp(\theta) - m^{\perp'}(\theta) = -\frac{f^\perp L}{2} + \frac{1}{2}\sqrt{f^{\perp 2} L^2 - 4a^2 - 4af^\perp L}, \quad (30)$$

gdje je $a = a(\theta) = 2\left|\vec{d}\right|f^\parallel(\theta)\theta$.

U konačnici ove veze od početnih 16 Taylorovih koeficijenata ostavljaju njih 6 slobodnima, te je sljedeći korak, koji će biti nastavljen u diplomskom radu, njih odrediti, analogno prethodno u diskretnom modelu opisanom procesu uspoređivanja oblika mikrotubula snimljenih mikroskopijom sa rezultatima statičke Kirchofove jednadžbe, kako bismo iz uslikanih oblika mikrotubula odredili sile i momente.

4 Zaključak

Kako bismo opisali statičku ravnotežu diobenog vretena u metafazi, krenuli smo od poznatog modela ravnoteže i prilagodili ga aproksimaciji srednjeg polja, s ciljem da je on primjenjiv na ravnotežu cjelokupnog diobenog vretena. Reproducirani rezultati Novak *et. al* o statičkoj ravnoteži diobenog vretena u metafazi za diskretni slučaj su primijenjeni kao temelj za prelazak u aproksimaciju čvrstog polja. Dobiveni kontinuirani model opisuje ravnotežu u diobenom vretenu, te za daljnji znanstveni rad u sklopu grupe izv. prof. dr. sc. Nenada Pavina preostaje ispitivanje rezultatnih oblika mikrotubula uslijed nastalih deformacija i identificiranje njima pripadajućih sila i momenata kako bi se upotpunila mapa sila i momenata diobenog vretena.

5 Zahvale

Zahvaljujem se svom mentoru izv. prof. dr. sc. Nenadu Pavinu i mag. phy. Ivani Ban, kao i ostalim članovima Pavin-Tolić grupe, na njihovoj strpljivoj i metodičnoj pomoći pri izradi seminara.

6 Literatura

Literatura

- [1] Pavin, N. & Tolic, I. M. Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle. *Annu. Rev. Biophys.* 45, 279-298 (2016)
- [2] Sharp, D. J., Rogers, G. C. & Scoley, J. M. Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407, 41-47 (2000)
- [3] Dogterom, M., Kerssemakers, J. W., Romet-Lemonne, G. & Janson, M. E. Force generation by dynamic microtubules. *Curr. Op. Cell Biol.* 17, 67-74 (2005)
- [4] McIntosh, J. R., Molodtsov, M. I. & Ataullakhanov F. I. Biophysics of Mitosis. *Q Rev Biophys* 45, 147-207 (2012)

- [5] Cheeseman IM, Desai A. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:33–46
- [6] Ding R, McDonald KL, McIntosh JR. 1993. Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol.* 120:141–51
- [7] Maja Novak, Uloga premosnih mikrotubula u ravnoteži sila diobenog vretena, doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
- [8] Pavin N. & Tolic-Norrelykke I. M. Swinging a sword: how microtubules search for their targets. *Syst Synth Biol* 8, 179–186 (2014).
- [9] Tolic I.M., Pavin N. Bridging the gap between sister kinetochores. *Cell Cycle.* 2016;15:1169–1170.
- [10] Kajtez, J., Solomatina, A., Novak, M., Polak B., Vukušić K., Rüdiger, J., Cojoc, G., Milas, A., Šumanovac Šestak, I., Risteski, P., Tavano, F., Klemm, A. H., Roscioli, E., Welburn, J., Cimini, D., Glunčić, M., Pavin, N. & Tolić, I. M. Overlap microtubules link sister k-fibres and balance the forces on bi-oriented kinetochores *Nat. Comm.* 7, 10298-10309 (2016)
- [11] Kurz, J. C. & Williams, R. C. Microtubule-associated proteins and the flexibility of microtubules *Biochemistry* 34, 13374-13380 (1995)
- [12] Begg, D. A. & Ellis, G. W. Micromanipulation studies of chromosome movement. I. Chromosome-spindle attachment and the mechanical properties of chromosomal spindle fibers. *J. Cell Biol.* 82, 528-541 (1979)
- [13] Dumont, S. & Michinson, T. J. Force and length in the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 19(17), 749-761, (2009)
- [14] Maja Novak , Bruno Polak , Juraj Simunić, Zvonimir Boban, Barbara Kuzmić, Andreas Thomae, Iva M. Tolić & Nenad Pavin, The mitotic spindle is chiral due to torques within microtubule bundles, unpublished manuscript
- [15] Landau, L. D. & Lifshitz, E. M. *Theory of Elasticity (Course of Theoretical Physics, Volume 7)*. Institute of Physical Problems, USSR Academy of Sciences: Pergamon Press (1970)