

# Utjecaj strukture imovine na pokazatelje aktivnosti i profitabilnost poduzeća u farmaceutskoj industriji

---

Anić Jerebić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Economics and Business / Sveučilište u Zagrebu, Ekonomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:999:238345>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-18**



*Repository / Repozitorij:*

[karaka4.srce.hr](http://karaka4.srce.hr)

# Teorija gubitka kromosoma u stanicama različite ploidije

---

Jelenić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:949180>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-11-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
FIZIČKI ODSJEK

Ivan Jelenić

TEORIJA GUBITKA KROMOSOMA U  
STANICAMA RAZLIČITE PLOIDIJE

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
FIZIČKI ODSJEK

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
FIZIKA; SMJER: ISTRAŽIVAČKI

**Ivan Jelenić**

Diplomski rad

**Teorija gubitka kromosoma u stanicama  
različite ploidije**

Voditelj diplomskog rada: izv. prof. dr. sc. Nenad Pavin

Ocjena diplomskog rada: \_\_\_\_\_

Povjerenstvo: 1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Datum polaganja: \_\_\_\_\_

Zagreb, 2017.

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Nenadu Pavinu na pruženoj prilici, prenesenom znanju, strpljenju i podršci u izradi ovoga rada.

Zahvaljujem se članovima grupe profesora Pavina i grupe prof. dr. sc. Ive Tolić na brojnim seminarima na kojima sam mnogo naučio.

Zahvaljujem dr. sc. Zlaku Brkljači na diskusijama i prijateljskoj potpori.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na ukazanom razumijevanju, strpljenju te moralnoj i financijskoj potpori tijekom čitavog mog školovanja.

## Sažetak

Korištenjem poznatih podataka o dijelovima i procesima u stanici tokom diobe, postavili smo model dinamike između populacija stanica u raznim djelovima prometofaze, metafaze i anafaze. Rješavanjem pojednostavljenog modela uvidili smo važnost uvođenja vremenskog limita, kojeg uvodimo u obliku *spindle assembly checkpoint*-a (SAC-a). Rješavanjem općenitog modela uviđamo da populacije stanica sa više kromosoma sporije napreduju u formiranju diobenog vretena. Takve stanice kasne u metafazu i anafazu te imaju veći gubitak kromosoma. Ispitali smo neke od važnijih ili manje poznatih parametara kako bi ustanovili njihov utjecaj na trajanje formiranja diobenog vretena te gubitak kromosoma. Trajanje formiranja diobenog se povećalo sa povećanjem broja kromosoma i za male iznose parametra  $\alpha$ , koji označava odnos broja mikrotubula i kromosoma, dok je geometrija stanica manje utjecajna. Nadalje smo ispitali parametre vezane za SAC te ustanovili važnost i utjecaj na gubitak kromosoma.

# Theory of chromosome loss in cells with different ploidy

## Abstract

Using known information and data about cell parts and processes during cellular division, we made a model of population dynamics between cells in different stages of prometaphase, metaphase and anaphase. By solving the simplified model, we saw the importance of introducing a time limit, which we introduce in the form of the spindle assembly checkpoint and the time where cells skip it. We solved the general model and found that populations of cells with more chromosomes form the spindle more slowly, and are thus late into metaphase and anaphase, and have a higher chromosome loss. We examined some of the more important or unknown parameters to find how they influence the duration of the spindle assembly and chromosome loss. The duration of spindle assembly increases with the increase in the number of chromosomes in a cell, and with smaller values of the parameter  $\alpha$ , which comes from the relation between the number of microtubules and chromosomes. The geometry affects the duration of spindle assembly less than the already listed parameters. Furthermore, we examined the parameters involved in modelling SAC, and determined their importance on chromosome loss.

## Sadržaj

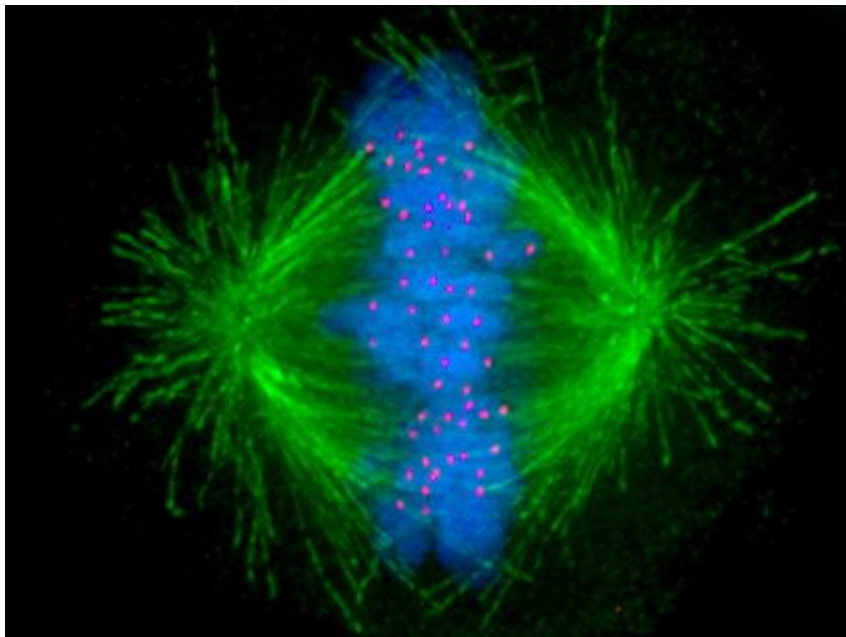
1. Uvod .....	1
1.1. Podjela stanica .....	1
1.2. Poliploidija.....	3
1.3. Aneuploidija.....	4
1.4. Gubitak kromosoma u diploidnim i tetraploidnim stanicama.....	5
2. Model.....	7
2.1. Uvod u model.....	7
2.2. Prometafaza, metafaza i anafaza.....	7
2.3. Diferencijalne jednačbe dinamike populacija.....	8
2.4. Koeficijenti brzine prijelaza.....	11
3. Rezultati pojednostavljenog modela.....	14
4. Rezultati.....	18
4.1. Numeričke metode i vrijednosti parametara .....	18
4.2. Stanice s jednim kromosomom.....	19
4.3. Usporedba haploidnih, diploidnih i tetraploidnih stanica .....	22
4.4. Parametri modela .....	25
5. Zaključak .....	31
Literatura .....	I



## 1. Uvod

### 1.1. Podjela stanica

U ovom radu razmatrat ćemo neke od djelova mitoze, koja je dio ciklusa života stanice gdje ona prestaje rasti te se aseksualno djeli. Stanica se priprema za mitozu udvostručavanjem svog genetskog materijala i ostalih djelova stanice potrebnih za podjelu, poput centrosoma. [1, 2] Okrugli pločasti centrosomi su centri za organizaciju mikrotubula, tankih šupljih cilindričnih filamenata sastavljenih od proteina tubulina. U prometafazi, koja je prva faza koju ćemo promatrati, mikrotubuli nukleiraju iz dva centrosoma te svojim rastom, nasumičnim gibanjem i interakcijama sa raznim djelovima stanice, guraju centrosome na suprotne strane stanice. Pritom „hvataju“ kromosome i ostale mikrotubule te formiraju diobeno vreteno. Svaki kromosom ima dvije sestrinjske kinetohore sa kojima se mikrotubuli povezuju kad „uhvate“ kromosom te dvije sestrinjske kromatide identične DNK.



Slika 1. Slika metafaze u ljudskoj stanici. Zelenom bojom su označeni mikrotubuli diobenog vretena, kromosomi su označeni plavom bojom, a njihove kinetohore crvenom. Centrosomi nisu označeni, ali se njihov položaj može približno uočiti ako lijevo i desno potražimo centar iz kojeg izlaze mikrotubuli.

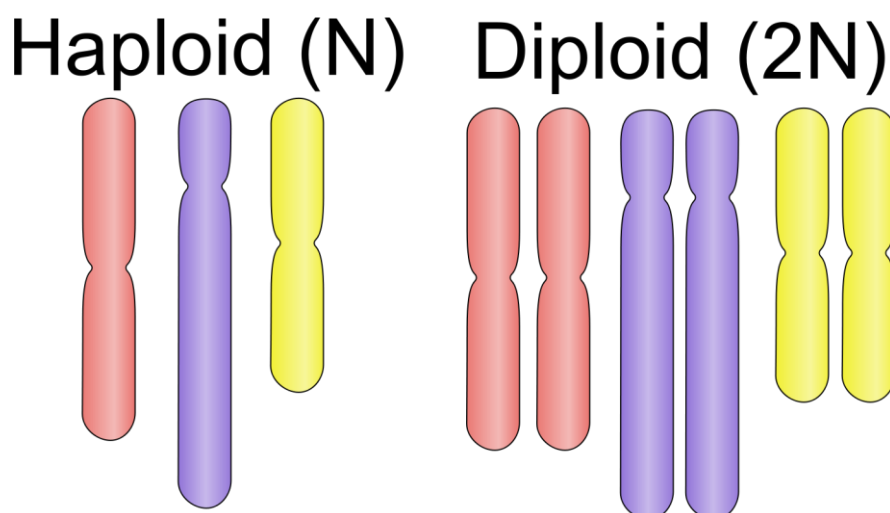
Uхват svih kromosoma označava početak metafaze. Proteinski molekularni motori počinju stvarati sile na mikrotubule diobenog vretena, koje poslažu kromosome po simetralnoj, metafaznoj, ravnini između centrosoma. Stanica ispravlja pogreške u hvatanju kromosoma i obliku diobenog vretena tako što aktivni signal *spindle assembly checkpoint* (SAC) signalizira postojanje nepravilnosti te ne dopušta stanici da ode u anafazu dok se ne isprave pogreške. Kad se one isprave, signal se gasi te stanica nastavlja podjelu. [3]

U anafazi se mikrotubuli skraćuju i centrosomi udaljuju, što uzrokuje kidanje veze između sestrinjskih kromatida u kromosomima. Razdvojene kromatide putuju svaka prema svome centrosomu te u ostatku mitoze, koji nećemo promatrati u ovom radu, čine kromosome dviju novih stanica.

Stanica može i preskočiti SAC ako je dovoljno dugo u prometafazi ili metafazi, i nastaviti direktno u anafazu, sa nepravilnostima u diobenom vretenu, poput neuhvaćenih kromosoma [3-6].

## 1.2. Poliploidija

Poliploidija stanica je česta pojava u prirodi gdje one imaju jednu ili više kopija cijelog seta kromosoma. Organizmi sa jednostrukim brojem kromosoma u stanicama se nazivaju haploidi ili haploidne stanice te se obično označavaju sa  $1N$ ; gamete raznih organizama spadaju u tu kategoriju, kao i neke vrste mrava. Stanice sa dvostrukim brojem kromosoma su diploidne ( $2N$ ). Velika većina sisavaca, uključujući i ljude, ima diploidne somatske stanice, sa izuzetkom nekoliko vrsta miševa. Poliploidne stanice su redom triploidne ( $3N$ ), tetraploidne ( $4N$ ) itd. U velikom broju biljaka može se naći zamjetan broj triploidnih i tetraploidnih stanica, kao i u stanicama nekih ljudskih organa, npr. srca, koje u starijih ljudi može čak i imati malen udio oktaploidnih stanica.



Slika 2. Shema stanica koje imaju tri kromosoma (npr. *Saccharomyces pombe*), gdje je lijeva slika sa jednim setom kromosoma (haploidne stanice), a desna sa dva seta kromosoma (diploidne).

Važnost poliploidije se očituje u povećanoj brzini prilagodbe takvih stanica na razne utjecaje i svojstva okoline, koja su često negativna. Na *in vitro* primjeru tetraploidnih stanica *Saccharomyces cerevisiae*, možemo vidjeti kako stanice sa povećanom ploidiom imaju veću sposobnost preživljavanja, veći broj stanica sa viškom ili manjkom kromosoma te povećan broj točkastih mutacija (eng. *point mutations*), tj. mutacija koje zahvaćaju samo jedan gen ili njegov dio. [7] Uzrok poliploidije možemo naći u defektima tokom podjele stanica, stresu kojem su stanice izložene, utjecajima starenja stanica, oksidativnim oštećenjima itd. Ovakvi negativni utjecaji često vode ka zaustavljanju ciklusa stanice, apoptoziji (smrti stanice), različitim bolestima (uključujući neke vrste raka), ili fenomenu gdje smrtnost stanica kod gubitka kromosoma ovisi o njihovoj ploidi – u haploidnim i

diploidnim stanicama *S. cerevisiae* gubitak određenog kromosoma nije fatalan, dok u triploidnim i tetraploidnim on dovodi do smrti stanice [8]. Diploidne stanice su genetski stabilnije, ali predloženo je da su kratkoročno stanice veće ploidijske, možda baš zbog njihove manje genetske stabilnosti, bolje sposobne prilagoditi se okolini. Takve stanice se onda diferenciraju nedostatkom ili viškom raznih kromosoma i mutacijama te neke imaju veću tolerantnost na negativne utjecaje pa lakše preživljavaju, dok druge imaju manju, što dovodi do izumiranja takvih stanica.

### **1.3. Aneuploidija**

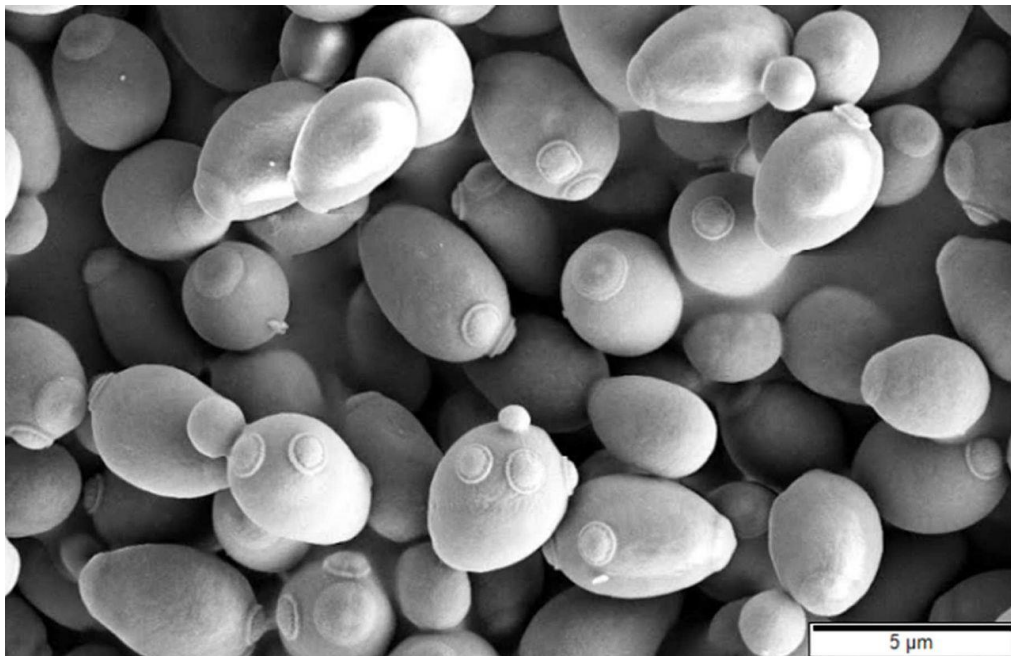
Stanice sa aneuploidijom posjeduju broj kromosoma koji je različit od uobičajenog broja. Udio stanica sa aneuploidijom je često malen u usporedbi sa brojem stanica u cijeloj populaciji, a zahvaćene stanice često imaju samo nekoliko kromosoma manje ili više nego ostale stanice. Aneuploidiju mogu uzrokovati greške tokom podjele stanica, gdje nas u ovom radu specifično zanimaju stanice koje tokom izlaska iz prometafaze imaju neke kromosome koji su uhvaćeni mikrotubulima sa samo jednog SPB-a, ili uopće nisu uhvaćeni. Nakon stanične podjele, kromosom uhvaćen samo sa jedne strane završit će kao višak u jednoj stanici, a druga stanica će imati manjak. Kromosom koji uopće nije uhvaćen završit će nasumično u jednoj od dviju stanica. Neki od ostalih uzroka aneuploidije su posljedice djelovanja štetnih faktora koji oštećuju DNK i druge djelove važne za podjelu stanica, što nije razmatrano u ovom radu.

Stanice pogođene aneuploidijom mogu doživjeti značajnu promjenu u stabilnosti genoma te njihova vjerojatnost preživljavanja uvelike zavisi o konkretno zahvaćenim kromosomima i njihovom broju, tako što se povećava ili smanjuje njihova podobnost za preživljavanje (eng. *fitness*) i prilagodba na okolinu u kojoj se nalaze. Utjecaj aneuploidije se također može vidjeti na povećanju broja točkastih mutacija, broju mitotskih rekombinacija, gubitka cijelih kromosoma i defektnom popravku DNK. Pokazano je da aneuploidija vodi na pojavu različitih bolesti. U ljudi ona vodi do odumiranja zahvaćenih stanica, pojave nekih oblika raka, ili bolesti kao što su npr. Downov i Turnerov sindrom koji su redom višak kromosoma 21 i nedostatak kromosoma X kod žena. Aneuploidija većeg broja kromosoma u stanicama najčešće vodi do nefunkcionalnosti tih stanica, odnosno smrti stanice. Biljke i stanice gljivičnih mikroorganizama kao što su *S. cerevisiae* imaju veću toleranciju na pojavu aneuploidije.

#### 1.4. Gubitak kromosoma u diploidnim i tetraploidnim stanicama

Zbog svoje jednostavne građe, lakoće i brzine uzgoja kvasac je idealan organizam za proučavanje te su nekoliko vrsta kvasca, posebno *S. cerevisiae*, koji nas zanima u ovom radu, neki od naproučavanijih eukariotskih organizama. Lako se manipuliraju u laboratoriju i imaju malu količinu genetskog materijala, što je pomoglo u objašnjavanju nekih fundamentalnih procesa kao što su ciklus stanice, replikacija DNK, rekombinacija, dioba stanica i metabolizam. Kako stanice kvasca neke procese i gene dijele sa ljudima (*S. cerevisiae* ima 31% homologa sa ljudskim genima) i ostalim organizmima, kvasac je pomogao u otkrivanju procesa i funkcija gena u ljudskim stanicama.

Izgled i podjela *S. cerevisiae* različita je u mnogim detaljima nego u ljudskim stanicama. Lako uočljiva razlika je pojava „pupoljka“ pri diobi, otkuda je i poznat pod engleskim imenom *budding yeast* (pupajući kvasac na engleskom), a njihove razne druge sorte poznate su kao pekarski ili pivski kvasac. Nama najbitnija razlika je su što je diobeno vreteno uže, gotovo ravno te broj kromosoma koji je samo 16 kod haploidnih stanica. Centrosom kod kvasca ima drugačiji naziv i zove se *spindle pole body* (SPB), što na hrvatskom znači tijelo pola diobenog vretena.



Slika 3. Elektronski mikrograf *S. cerevisiae*. Vidljiv je izdužen oblik stanice i pupoljak koji se stvara tokom podjele.

U stanicama kvasca *S. cerevisiae* gubitak određenih kromosoma tokom mitoze može biti i do tisuću puta veći u *in vitro* tetraploidnim stanicama, gdje je udio takvih stanica približno  $10^{-3}$ , nego u diploidnim stanicama, gdje je udio približno  $10^{-6}$ . [8-10] Zanimljivo je da dvostruki broj kromosoma vodi povećanju gubitka kromosoma od nekoliko redova veličine. Možemo hipotetski pretpostaviti da povećanje broja kromosoma vodi do pojave većeg broja pogrešaka zbog povećanja broja uključenih procesa i dijelova stanice. Većina organela koji rastu, kao i dimenzije stanice, rastu linearno sa brojem kromosoma te iz ovakve jednostavne pretpostavke nije vidljivo kako se postiže razlika od nekoliko redova veličine u broju izgubljenih kromosoma. Ovakvo povećanje u količini grešaka može kod stanica izloženih novoj okolini ubrzati prilagodbu stanica na izmjenjene uvjete. [7]

## 2. Model

### 2.1. Uvod u model

Jedno od mogućih objašnjenja gubitka različitog broja kromosoma u stanicama sa različitim brojem kromosoma opisat ćemo modelom koji ovdje predstavljamo. Modeliramo cijelu populaciju stanica na temelju procesa i djelova reprezentativne stanice, koristeći diferencijalne jednadžbe za brzinu odvijanja procesa. Ovo se razlikuje od ostalih modernih modela koji se fokusiraju samo na jednu stanicu, a ne cijelu populaciju te koriste jednadžbe gibanja, zakone klasične mehanike i stohastiku.

Promatrat ćemo dio ciklusa stanica u mitozu koji se odnosi na mehanizme podjele stanice tokom prometafaze, metafaze i anafaze. Svaku od ovih faza matematički ćemo definirati te povezati diferencijalnim jednadžbama dobivenim razmatranjem fizikalnih procesa i svojstava djelova stanice.

### 2.2. Prometafaza, metafaza i anafaza

Na početku prometafaze, svi kromosomi u stanici su slobodni. Udio takvih stanica u ukupnoj populaciji označavamo sa  $n_{00}$ . Kako se novi mikrotubuli nukleiraju i rastu, tokom vremena dolazi do njihovog kontakta sa kinetohorama, pri čemu se oni vežu te čine diobeno vreteno. Ovakav općeniti slučaj označavamo sa udjelom stanica  $n_{ij}$ , gdje su se mikrotubuli lijevog i desnog SPB-a povezali sa  $i$  odnosno  $j$  kinetohora, gdje je  $i, j = 0, \dots, C$ , a  $C$  je broj kromosoma. U prometafazi, pojedini udio stanica sa različitim brojem uhvaćenih kromosoma je  $n_{ij}$ , gdje je  $i \neq C$  i/ili  $j \neq C$ . Stanice iz prometafaze prelaze u metafazu ako su uhvatile sve kromosomske kinetohore i uspješno formirale diobeno vreteno, pa njihov udio u ukupnom broju stanica označavamo sa  $n_{CC}$ , što predstavlja slučaj sa  $i = C$  i  $j = C$ . Stanice u anafazi dijelimo u dvije grupe, stanice koje nisu uspjele uhvatiti sve kinetohore, udjela  $n_L$ , i one koje su uhvatile sve kinetohore, udjela  $n_A$ . Stanice u anafazi koje nisu uhvatile sve kromosome preskočile su metafazu te su prešle u anafazu direktno iz prometafaze. U ovom radu udio populacije stanica u anafazi bez svih uhvaćenih kromosoma,  $n_L$ , najvažnija nam je vrijednost te nam govori koliki je udio stanica sa gubitkom kromosoma.

### 2.3. Diferencijalne jednačbe dinamike populacija

Promjenu udjela populacija stanica sa različitim brojem uhvaćenih kinetohora te prijelaz u metafazu i anafazu, prikazujemo sustavom  $2(C + 1)^2 - 1$  diferencijalnih jednačbi prvog stupnja u vremenu  $t$ , simetričnih s obzirom na  $i$  i  $j$ .

$$\frac{dn_{ij}}{dt} = k_{i-1}^+ n_{i-1j} + k_{j-1}^+ n_{ij-1} - (k_i^+ + k_i^- + k_j^+ + k_j^- + k_{A,L}) n_{ij} + k_{i+1}^- n_{i+1j} + k_{j+1}^- n_{ij+1} \quad i, j = 0, \dots, C \quad (1)$$

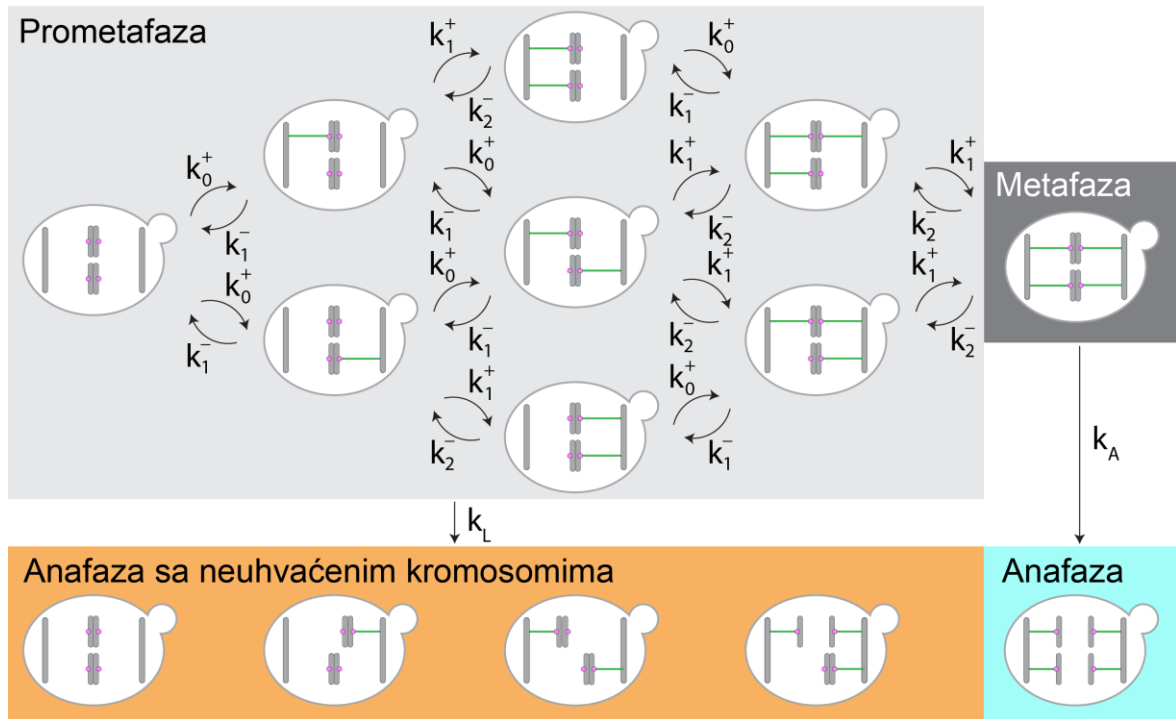
$$k_{A,L} = \begin{cases} k_A & \text{za } i = j = C \\ k_L & \text{inače} \end{cases}$$

$$\frac{dn_A}{dt} = k_A n_{CC} \quad (2)$$

$$\frac{dn_L}{dt} = k_L \sum_{i,j} n_{ij} \quad i \neq C \text{ ili } j \neq C \quad (3)$$

Koeficijenti  $k_i^+$  i  $k_i^-$  su, redom, brzine kojima mikrotubuli hvataju i otpuštaju kinetohore, gdje  $i$  označava broj već uhvaćenih kinetohora sa lijeve strane, a  $j$  desne strane. Koeficijent  $k_A$  je brzina prijelaza stanica sa svim uhvaćenim kinetohorama iz metafaze u anafazu, a  $k_L$  je brzina prijelaza stanica koje nisu uhvatile sve kinetohore iz prometofaze u anafazu (preskaćući metafazu i SAC) te prijelaz nekih stanica iz metafaze u anafazu.





Slika 4. Ilustracija populacija stanica u raznim fazama podjele te koeficijenti brzine prijelaza koji ih povezuju.

Razni članovi u jednadžbama (1-3) odnose se na uhvat i otpuštanje kinetohora te prijelaze stanica iz jedne u drugu populaciju. Specifično, članovi sa:

1.  $k_{i-1}^+$  označavaju prijelaz stanica  $i - 1 \rightarrow i$
2.  $k_i^+$  označavaju prijelaz stanica  $i \rightarrow i + 1$
3.  $k_{i+1}^-$  označavaju prijelaz stanica  $i + 1 \rightarrow i$
4.  $k_i^-$  označavaju prijelaz stanica  $i \rightarrow i - 1$
5.  $k_A$  i  $k_L$  označavaju, redom, prijelaz stanica iz metafaze i prometafaze u anafazu

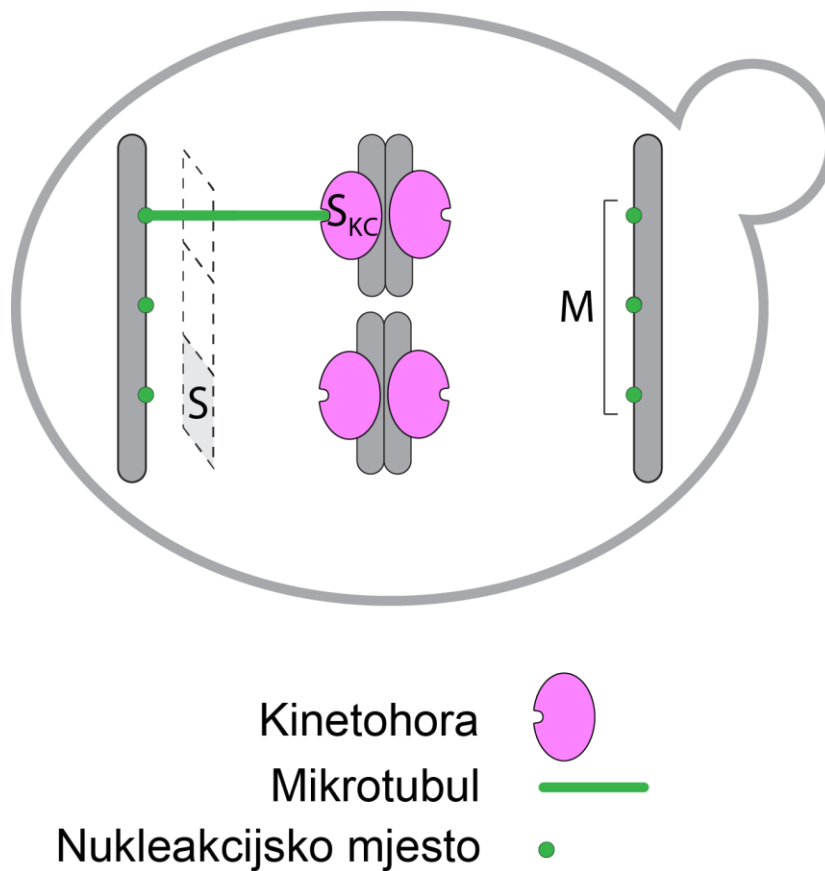
Nerealne slučajeve za  $i, j \neq 0, \dots, C - 1$  isključujemo sa  $k_i^+ = k_j^+ = 0$ , jer ne možemo uhvatiti kinetohore koje ne postoje ili uhvatiti ih ako su sve već uhvaćene. Slično za  $i, j \neq 1, \dots, C$  sa  $k_i^- = k_j^- = 0$ , jer ne možemo otpustiti kinetohore ako nijedna nije uhvaćena.

Jednadžba (1) opisuje uhvat i otpuštanje kromsoma u prometafazi te njihovo otpušanje u metafazi. Članovi sa  $n_A$  i  $n_L$  predstavljaju prijelaz u anafazu. Jednadžba (2) opisuje prijelaz stanica iz metafaze  $n_{CC}$  u anafazu  $n_A$ , gdje su svi kromosomi uspješno uhvaćeni s obje strane. Prijelaz se može dogoditi normalno ili preskaćući SAC, što je objašnjeno u sljedećem poglavlju. Jednadžba (3) prikazuje prijelaz iz prometafaze  $n_{ij}$  u anafazu  $n_L$ , gdje stanice nisu uhvatile sve kromosome, pritom preskaćući metafazu, gdje  $i \neq C$  ili  $j \neq C$  kako bi isključili metafazu. Kod  $n_A$  i  $n_L$ , A stoji za Anafazu, a L za eng. *Loss* – gubitak (kromosoma).

Ukupni udio stanica je sačuvan u vremenu i normaliziran na jedinicu  $\sum_{i,j=0}^C n_{ij} + n_A + n_L = 1$ , tj. 100%. Sačuvanje ovog broja slijedi iz prijelaza stanica iz jedne populacije ili faze podjele u drugu, bez ikakvih gubitaka zbog apoptoze (smrti stanica) te zbog ograničenja modela na podjelu samo do anafaze. Početni uvjet u  $t = 0$  s je da su sve stanice u prometafazi te imaju sve kromosome slobodne, tj.  $n_{00} = 1$ , a ostali udjeli su nula.

#### 2.4. Koeficijenti brzine prijelaza

Jednadžbe modela slične su lančanim kemijskim jednadžbama koje opisuju promjenu udjela pojedinih reaktanata i produkata, ili lančanim reakcijama nuklearnih raspada i uhvata, gdje koeficijenti  $k$  predstavljaju konstante reakcije ili raspada. Brzine uhvata ili otpuštanja kromosoma  $k_i^\pm$  nisu konstante u ovom modelu, već ovise o broju kromosoma  $C$ , broju uhvaćenih kromosoma  $i$  te različitim parametrima.



Slika 5. Shema dijelova stanice najvažnijih za model. Površina  $S$  označava površinu jednog nukleacijskog mjesta na *spindle pole body*-u (dugački sivi štapić na slici), dok površina  $S_{KC}$  označava površinu kinetohore na kromosomu (kratki sivi štapić). Broj  $M$  je broj nukleacijskih mjesta iz kojih nukleiraju mikrotubuli.

Kako bi objasnili brzine uhvata i otpuštanja kromosoma, promotrimo neke dijelove koji sudjeluju u diobi. Stanica koja ulazi u prometafazu je već udvostručila sve organele i dijelove potrebne za uspješnu diobu. Nama važni dijelovi stanice su dva *spindle pole body*-a, koji su direktno povezani sa formacijom diobenog vretena kao centri za organizaciju mikrotubula. Iz njih mikrotubuli nukleiraju iz  $M$  nukleacijskih mjesta, gdje je iz eksperimentalnih mjerenja poznato da  $M$  linearno ovisi o broju kromosoma u stanici približno kao  $M = \alpha \cdot C + 4$ , gdje je  $\alpha \approx 1$ . [8, 13] Frekvencija nukleacije mikrotubula iz SPB-a je  $\nu = 3 \text{ min}^{-1}$  po nukleacijskom mjestu. Kako broj uhvaćenih kromosoma  $i$  raste sa vremenom, nužno raste i broj nukleiranih mikrotubula, stoga je broj slobodnih nukleacijskih mjesta približno  $M - i$ . Tada je ukupna nukleacija SPB-a sa  $i$  uhvaćenih kromosoma  $\nu_i = \nu \cdot (M - i)$ .

Ukupnu površinu poprečnog presjeka diobenog vretena aproksimiramo površinom SPB-a, jer je diobeno vreteno *S. cerevisiae* gotovo ravno kao štap između oba SPB-a. Površina diobenog vretena je stoga jednaka  $S \cdot M$ , gdje je  $S$  površina jednog nukleacijskog mjesta. Vjerojatnost da mikrotubul dođe u kontakt sa kintohorom nekog kromosoma je približno  $p = S_{KC}/(S \cdot M + S_{KC})$ , gdje je  $S_{KC}$  površina kinetohore. Ova vrijednost aproksimativno odražava vjerojatnost prijeklopa površine SPB-a i kinetohore, što u modelu predstavlja jedinu mogućnost ravno rastućem mikrotubulu da pogodi kinetohoru. Vjerojatnost da mikrotubul ne pogodi kinetohoru je  $1 - p$ . Kako imamo  $C - i$  slobodnih kinetohora, vjerojatnost da mikrotubul ne pogodi ni jednu kinetohoru je  $(1 - p)^{C-i}$ , dok je onda vjerojatnost da pogodi neku kinetohoru  $1 - (1 - p)^{C-i}$ .

Nakon što smo uveli nukleaciju i vjerojatnost da mikrotubul pogodi neku kinetohoru, možemo definirati brzinu uhvata  $i$  neuhvaćenih kinetohora njihovim umnoškom:

$$k_i^+ = \nu_i [1 - (1 - p)^{C-i}], \quad i = 0, \dots, C - 1. \quad (4)$$

Ukupnu brzinu otpuštanja uhvaćenih kinetohora  $k_i^-$  smo aproksimirali linearnom vezom sa njihovim brojem  $i$  i vjerojatnošću otpuštanja jedne kinetohore  $k^-$ .

$$k_i^- = ik^-, \quad i = 1, \dots, C \quad (5)$$

Brzine prijelaza u anafazu označavamo sa  $k_A$  i  $k_L$ , gdje  $k_A$  označava prijelaz iz metafaze, a  $k_L$  prijelaz iz prometafaze.

$$\begin{pmatrix} k_A \\ k_L \end{pmatrix} = k_0 \begin{pmatrix} 1 + f(t) \\ f(t) \end{pmatrix}, \quad (6)$$

Obje brzine imaju isti konstantni faktor  $k_0$  koji nam govori brzinu prijelaza. Broj 1 u definiciji  $k_A$  dolazi od stanica koje normalno ulaze iz metafaze u anafazu brzinom  $k_0$ , dok funkcija  $f(t) = \exp[(t - t_0)/t_c]$  predstavlja preskakanje *spindle assembly checkpoint*-a i nastavak u anafazu, bez obzira je li stanica spremna nastaviti (metafaza) ili nije (prometfaza). Dok su stanice daleko od vremena preskoka SAC-a u trenutku  $t_0$ , one prelaze u anafazu gotovo isključivo iz metafaze, zbog malog iznosa funkcije  $f(t)$ . Kad vrijeme postane usporedivo ili veće od  $t_0$ , stanice mogu u značajnijem broju prelaziti u anafazu i iz prometafaze, što uzrokuje gubitak kromosoma. Vrijeme  $t_c$  predstavlja varijabilnost ovog efekta.

### 3. Rezultati pojednostavljenog modela

Kao specijalni slučaj, možemo prvo promotriti jednostavniji model hvatanja i otpuštanja kinetohora. Budući da je ovaj slučaj analitički rješiv za proizvoljni broj uhvaćenih kinetohora  $i$ , može nam dati zorniji pogled u ponašanje i oblik rješenja ovih jednažbi te pojasniti ponašanje općenitijeg modela. Jednažbe dinamike populacija su slične općenitijem modelu te glase

$$\frac{dn_0}{dt} = -Ck^+n_0 + k^-n_1 \quad (7a)$$

$$\frac{dn_i}{dt} = (C - (i - 1))k^+n_{i-1} - ((C - i)k^+ + ik^-)n_i + (i + 1)k^-n_{i+1} \quad i = 1, \dots, C - 1 \quad (7b)$$

$$\frac{dn_C}{dt} = k^+n_{C-1} - Ck^-n_C \quad (7c)$$

Brzine uhvata i otpuštanja su eksplicitno zapisane kao  $k_i^+ = (C - i)k^+$  i  $k_i^- = ik^-$ , gdje  $k^+$  odgovara nukleaciji u punom modelu. Prijelaz u anafazu je isključen.

Za rješavanje ovih jednažbi potrebni su nam početni uvjeti. U trenutku  $t = 0$  kromosomi u svim stanicama su slobodni, što u modelu odgovara slučaju da populacija s nijednim uhvaćenim kromosomom sadrži sve stanice  $n_0(0) = 1$ , a ostale populacije niti jednu, tj.  $n_i(0) = 0$  za  $i = 1, \dots, C$ . Koristeći diferencijalne jednažbe i ove početne uvjete, možemo dobiti početne uvjete za derivacije  $dn_0(0)/dt = -dn_1(0)/dt = -Ck^+$  te  $dn_i(0)/dt = 0$  za  $i = 2, \dots, C$ . Uzastopnim deriviranjem diferencijalnih jednažbi do derivacije  $N - 1$ -og stupnja, može se pokazati da one isčezavaju, tj.  $d^j n_C(0)/dt^j = 0$  za  $j = 0, \dots, C - 1$ , kao i derivacije ostalih populacija. Tada se sustav diferencijalnih jednažbi može riješiti korištenjem uobičajenih probnih rješenja za linearan sustav diferencijalnih jednažbi  $n_i = \sum_{j=0}^C A_j^{(i)} e^{-\lambda_j t} + B_j^{(i)}$  ili rješavanjem sustava diferencijalnih jednažbi kako bi se dobila diferencijalna jednažba za  $n_C$

$$\left[ \frac{d}{dt} + (k^+ + k^-) \right] \left[ \frac{d}{dt} + 2(k^+ + k^-) \right] \cdots \left[ \frac{d}{dt} + C(k^+ + k^-) \right] n_C - C!(k^+)^C = 0$$

Iz sadržaja svake od ovih uglatih zagrada je vidljivo da one zadovoljavaju osnovno homogeno rješenje oblika  $n_c^{H,j} = A_j e^{-j(k^+ + k^-)t}$  gdje je  $j = 1, \dots, C$  broj u svakoj zagradi ispred člana  $(k^+ + k^-)$ . Stoga je ukupno homogeno rješenje njihov zbroj. Nakon određivanja partikularnog rješenja, korištenjem početnih uvjeta možemo odrediti konstante  $A_j$ . Partikularno rješenje  $n_c^P = [k^+ / (k^+ + k^-)]^C$  se trivijalno dobije uvrštavanjem konstante kao probnog rješenja. Kako homogena diferencijalna jednačba i rješenja imaju pravilan niz koeficijenata  $j$ , njihovu sumu možemo prepoznati kao razvoj binomnog izraza oblika  $(1 - x)^C$ . Općenito rješenje za populaciju sa svim uhvaćenim kromosomima, za bilo koji broj kromosoma  $C$ , je tada

$$n_c(C, t) = \left( \frac{k^+}{k^+ + k^-} \right)^C \sum_{j=0}^C (-1)^j \binom{C}{j} e^{-j(k^+ + k^-)t} = \left[ \frac{k^+}{k^+ + k^-} (1 - e^{-(k^+ + k^-)t}) \right]^C$$

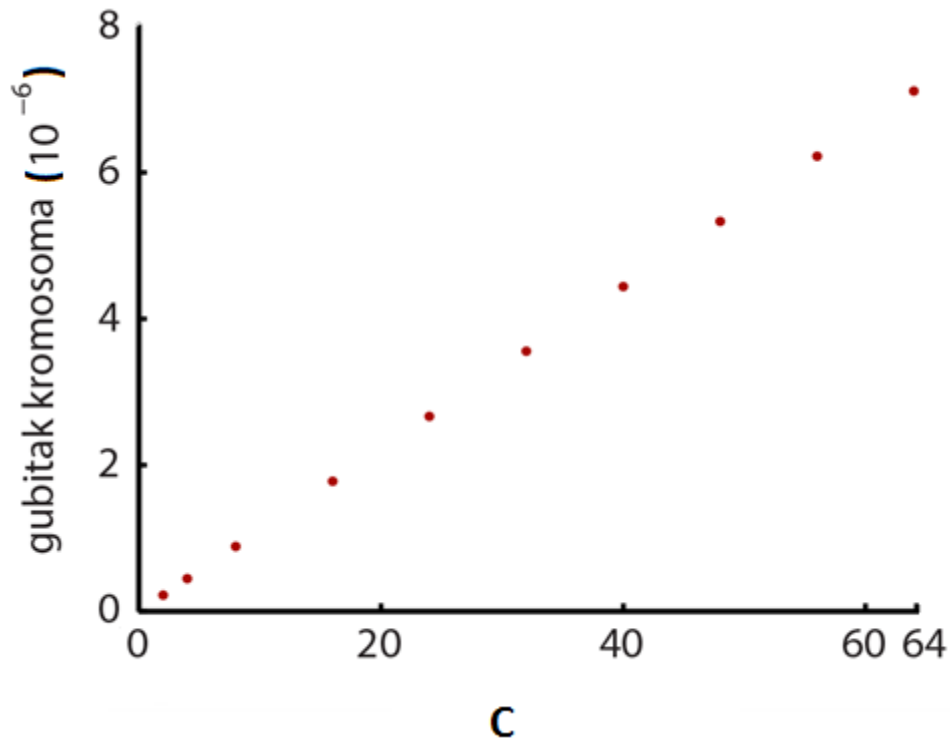
Iz ovog rješenja slijedi jednostavna, ali važna relacija koja pokazuje vezu populacija stanica sa populacijama koje imaju dvostruko više kromosoma  $n_{2C}(2C, t) = n_C(C, t)^2$ . Kako nas zanima udio populacije koji nije uhvatio sve kinetohore  $1 - n_C(C, t)$ , izraz možemo izmjeniti

$$\frac{1 - n_{2C}(2C, t)}{1 - n_C(C, t)} = 1 + n_C(C, t)$$

Udjeli populacija su uvijek između 0 i 1, stoga je iz ove relacija vidljivo da se broj neuhvaćenih kinetohora između dvije populacije, gdje jedna ima dvostruko veći broj kromosoma, mijenja približno linearno, dok eksperimentalni rezultati pokazuju razliku od nekoliko redova veličine. Ovo možemo zornije predložiti ukoliko  $1 - n_C(C, t)$  razvijemo u red po  $C$  za  $k^+t \gg k^-t \gg 1$  i zadržimo samo prvi bitni član

$$1 - n_C(C, k^+t \gg 1) = 1 - C \frac{k^-}{k^+}$$

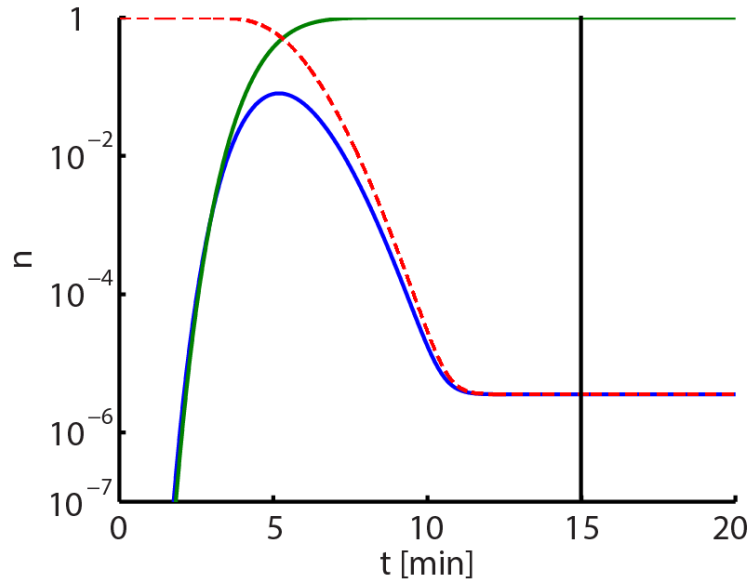
Iz ove relacije može se zaključiti da za povećanje broja kromosoma udio stanica sa gubitkom kromosoma linearno povećava. Na slici 6. vidljivo je da za ovakvo rješenje koje odgovara ponašanju za  $t \rightarrow \infty$  ne možemo objasniti nelinearnu promjenu u gubitku kromosoma između diploidnih i tetraploidnih stanica.



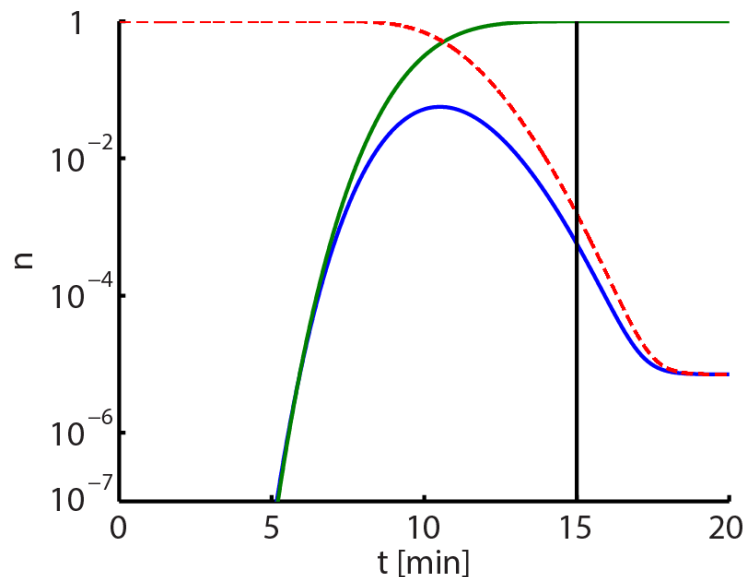
Slika 6. – Ovisnost udjela stanica koje nemaju sve kromosome u ovisnosti o broju kromosoma  $C$  za  $t \rightarrow \infty$ ,  $k^+ = 0.1 \text{ s}^{-1}$  i  $k^- = 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ .

Ako uzmemo u obzir da trajanje mitoze nije beskonačno dugo te se ograničimo na neko konačno vrijeme, npr. trajanje mitoze,  $t_m \approx 15 \text{ min}$ , gdje sve populacije još nisu u ravnotežnom dijelu rješenja, možemo vidjeti traženu razliku od nekoliko redova veličine, kao što je prikazano na slikama 7 i 8. Odavdje uočavamo nužnost uvođenja neke funkcije  $f(t)$  koja ograničava vrijeme koje stanice provode u prometafazi i metafazi, kao što je to u općenitom modelu.





Slika 7. Diploidna stanica *C. Cerevisiae*,  $C = 32$  kromosoma. Crvenom bojom je označena populacija koja nema sve uhvaćene kromosome, dok je populacija u zelenom sa svim uhvaćenim kromosomima. Populacija u plavom ima sve osim jednog uhvaćenog kromosoma. Okomita crna linija označava trenutak  $t_m = 15$  min u kojem je udio gubitaka kromosoma  $3.56 \cdot 10^{-6}$ . Brzine uhvata i otpuštanja kromosoma su  $k^+ = 0.1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k^- = 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ .



Slika 8. Tetraploidna stanica,  $C = 64$  kromosoma. Crvenom bojom je označena populacija koja nema sve uhvaćene kromosome, dok je populacija u zelenom sa svim uhvaćenim kromosomima. Populacija u plavom ima sve osim jednog uhvaćenog kromosoma. Okomita crna linija označava trenutak  $t_m = 15$  min u kojem je udio gubitaka kromosoma  $1.57 \cdot 10^{-3}$ . Brzine uhvata i otpuštanja kromosoma su  $k^+ = 0.1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k^- = 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ .

## 4. Rezultati

### 4.1. Numeričke metode i vrijednosti parametara

Analitičko rješenje modela (1-6) nije moguće zbog kompleksne ovisnosti jednadžbi o vremenu te je stoga model riješen numerički pomoću Eulerove metode. Eulerova metoda se pokazala opravdanom zbog glatkosti i monotonosti rješenja za velike vremenske intervale. Jednadžba (1) je simetrična s obzirom na  $i$  i  $j$  te čini kvadratnu matricu, stoga numerički računamo samo jedan trokut određen dijagonalom  $i, j$  matrice rješenja. Ovo pojednostavljenje ubrzava računanje, koje za sve račune zajedno traje manje od pola sata na prosječnom računalu.

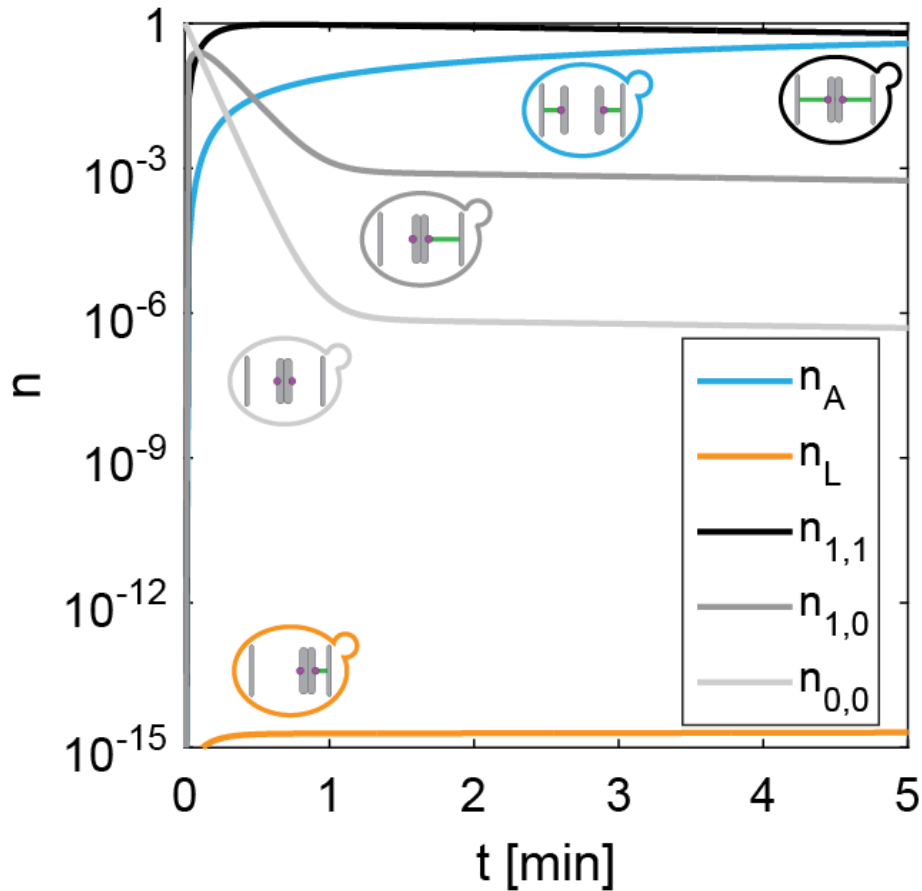
Parametri su navedeni u tablici 1. Neki od parametara poput površina kinetohora i nukleacijskih mjesta dobro su poznati, dok za parametre koji opisuju SAC nema dobrih vrijednosti u literaturi te su izabrane neke vrijednosti koje se čine realne i za koje se dobiva smisljena rješenja.

Parametar	Oznaka	Vrijednost	Izvor
Nukleacija	$\nu$	$3 \text{ min}^{-1}$	[12]
Omjer porasta broja mikrotubula sa brojem kromosoma	$\alpha$	1	[8, 13]
Površina kinetohore	$S_{KC}$	$10000 \text{ nm}^2$	[11]
Površina nukleacijskog mjesta	$S$	$2000 \text{ nm}^2$	[8, 13, 14]
Brzina otpuštanja mikrotubula	$k^-$	$0.66 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	[15]
Brzina preskakanja SAC-a	$k_0$	$0.1 \text{ min}^{-1}$	
Vrijeme preskakanja SAC-a	$t_0$	150 min	
Varijabilnost vremena preskakanja SAC-a	$t_c$	5 min	

Tablica 1. Parametri modela i njihove vrijednosti. Gdje je moguće, naveden je izvor. Neke vrijednosti su aproksimirane.

#### 4.2. Stanice s jednim kromosomom

Kako bi predstavili osnovne karakteristike rješenja pri prijelazu iz prometafaze u metafazu i anafazu te udio stanica sa gubitkom kromosoma u podjeli, promotrimo prvo jednostavan i ilustrativan slučaj kad stanice imaju samo jedan kromosom ( $C = 1$ ).

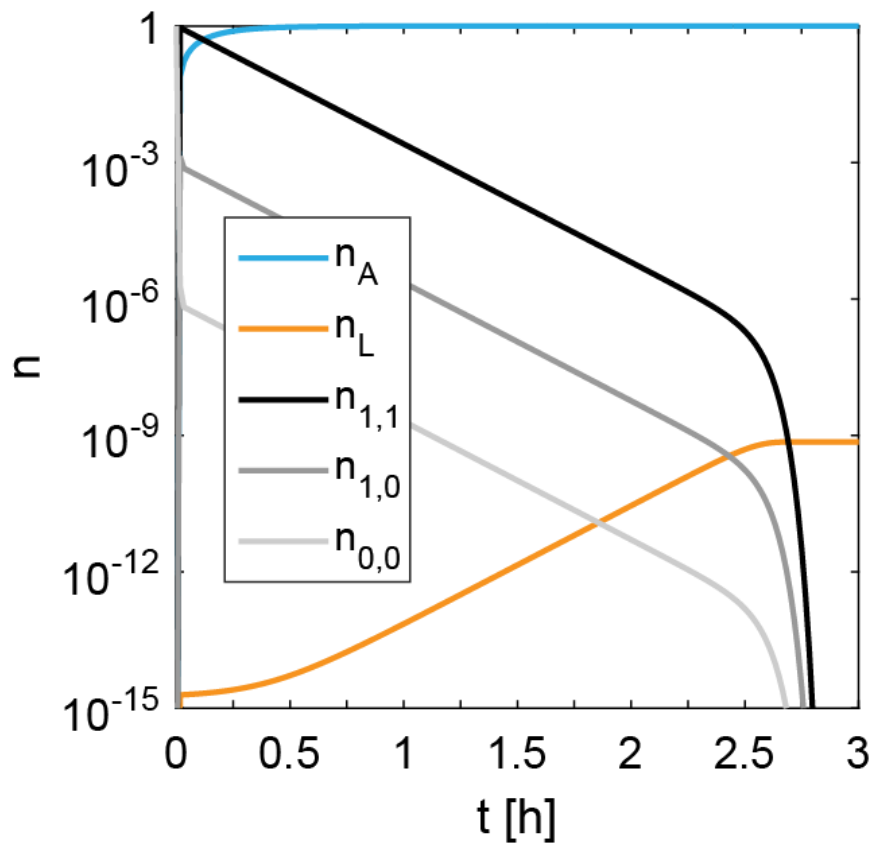


Slika 9. Rješenje modela za jedan kromosom do 5 minuta. Udio populacija stanica u prometafazi je prikazan nijansama sive boje ( $n_{0,0}$  i  $n_{1,0}$ ), dok je udio u metafazi crn. Udio u anafazi sa svim uhvaćenim kromosomima je označen plavom bojom, dok je u narančastoj boji udio stanica sa greškom. Uz svako rješenja prikazana je shema stanice sa prikladnim brojem uhvaćenih kinetohora na kromosomima.

Rešenje je prikazano na slikama 9. i 10., gdje vidimo promjenu populacija stanica u vremenu. Sve stanice počinju prometafazu u populaciji  $n_{0,0} = 1$  u trenutku  $t = 0$  s, vidljivo u najsvjetlijoj sivoj boji na sl. 9. Unutar 5 minuta značajan udio stanica uhvati kromosom bar sa jedne strane, što se vidi iz smanjenja početne populacije. Povećava se udio stanica koje su uhvatile kromosom sa jedne strane, vidljivo iz krivulje  $n_{1,0}$  (također  $n_{0,1}$  koja je identična, stoga nije prikazana).

Vrlo brzo slijedi metafaza gdje je kromosom uhvaćen sa obje strane, vidljivo u crnoj boji koja predstavlja populaciju  $n_{1,1}$ . Redosljed prijelaza iz populacije u populaciju se vidi iz nagiba oko  $t = 0$  s te vrhova rješenja, nakon kojih udio stanica pada zbog prijelaza u anafazu.

Anafaza je predstavljena rješenjima  $n_A$  (plavo) i  $n_L$  (narančasto), koji redom označavaju udio stanica koje su uspješno uhvatile kromosom sa obje strane te stanice koje nisu.

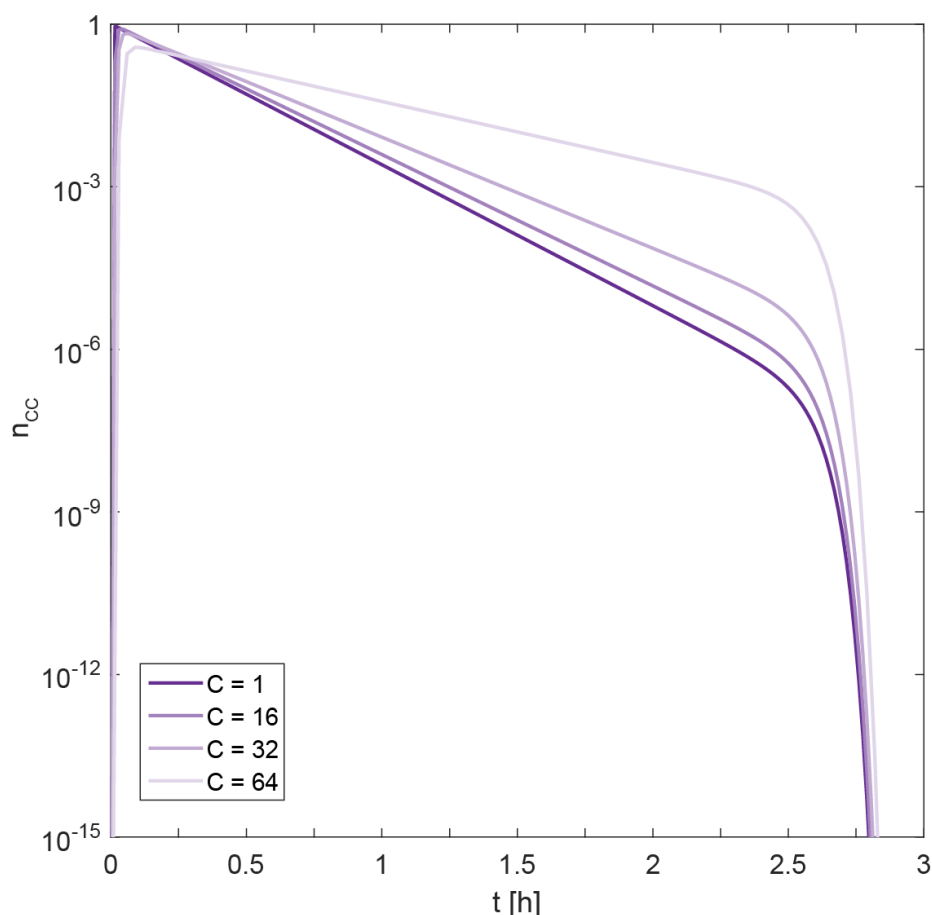


Slika 10. Rješenje modela za jedan kromosom do 3 sata. Udio populacija stanica u prometafazi je prikazan nijansama sive boje ( $n_{0,0}$  i  $n_{1,0}$ ), dok je udio u metafazi crn. Udio u anafazi sa svim uhvaćenim kromosomima je označen plavom bojom, dok je u narančastoj boji udio stanica sa greškom.

Za populacije stanica sa samo jednim kromosomom zaključujemo da vrlo brzo završe prometafazu i metafazu jer postignu veliki udio uspješnih prijalaza u anafazu unutar 5 minuta ( $n_A \approx 1$ ) te imaju mali udio stanica koje gube kromosome tokom podjele ( $n_L \approx 10^{-9}$ ). Nakon  $t \sim 5$  min vidljivo je da se udio stanica u anafazi sa svim uhvaćenim kromosomima (plavo) približava graničnoj vrijednosti kako sve zaostale stanice u prometafazi i metafazi polako prelaze u anafazu. Ova granična vrijednost postoji jer nije modeliran nastavak podjele i odumiranje stanica. Također, nakon 2.5 h, stanice u anafazi koje nisu uhvatile sve kromosome (narančasto) približavaju se graničnoj vrijednosti zbog početka djelovanja SAC-a.

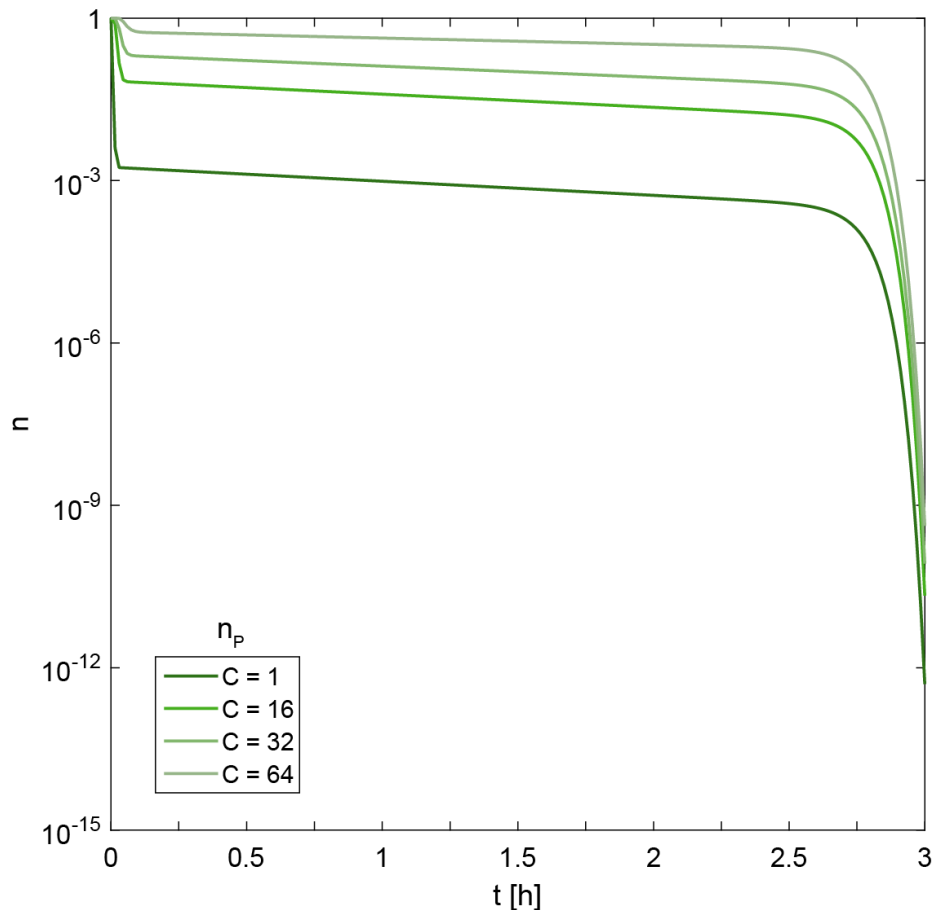
### 4.3. Usporedba haploidnih, diploidnih i tetraploidnih stanica

Usporedba sa eksperimentalnim vrijednostima gubitaka kromosoma u stanicama *S. cerevisiae* zahtjeva numeričko rješavanje modela za 16, 32 i 64 kromosoma (sl. 11, 12 i 13).



Slika 11. Udio populacija haploidnih, diploidnih i tetraploidnih stanica u metafazi, uz udio populacije stanica sa jednim kromosomom za usporedbu.

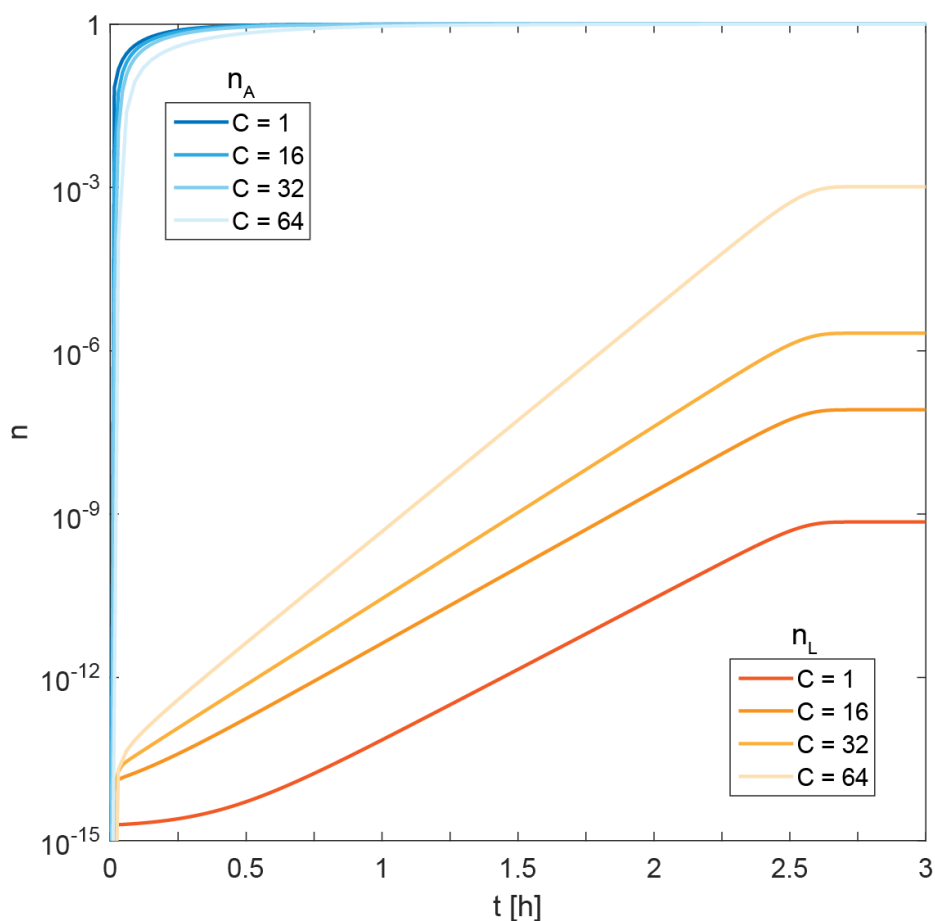
Udjeli stanica u metafazi za ova tri različita broja kromosoma prikazani su na sl. 11, uz rješenje za jedan kromosom za usporedbu. Kao i rješenje za populaciju stanica sa jednim kromosomom, haploidne, diploidne i tetraploidne stanice također imaju karakteristični vrh, ali stanice sa većim brojem kromosoma imaju niže i šire vrhove koji se pojavljuju sve kasnije kako se broj kromosoma povećava. Oko vremena  $t_0 = 2.5$  h može se uočiti utjecaj funkcije  $f(t)$ , što uzrokuje naglo smanjenje udjela stanica u metafazi zbog preskakanja *spindle assembly checkpoint*-a.



Slika 12. Udio populacija haploidnih, diploidnih i tetraploidnih stanica u prometafazi, uz udio populacije stanica sa jednim kromosomom za usporedbu.

Ukupan udio stanica u prometafazi je  $n_p = \sum_{i,j} n_{ij}$ , gdje  $i \neq C$  ili  $j \neq C$ , tj. isključujemo metafazu  $n_{CC}$  iz sume. Za udjele stanica u prometafazi vidljivo je, na sl. 12, da počinje od 1, jer na početku imamo 100% stanica koje nisu uhvatile kromosome, slijedi naglo smanjenje kako se broj stanica u metafazi povećava. Nakon ovog pada udjela, on se polako smanjuje kako stanice prelaze u anafazu, dok se ne približi trenutak  $t_0$ , gdje preskaču SAC kako bi ušli u anafazu, pa je zamjetan sličan pad kao na sl. 11.

Od svih udjela populacija za različite brojeve kromosoma, vidljivo je da tetraploidna populacija ima najviše stanica u prometafazi, stoga u anafazi očekujemo da ona ima najveće gubitke kromosoma.



Slika 13. Udio populacija haploidnih, diploidnih i tetraploidnih stanica u anafazi, uz udio populacije stanica sa jednim kromosomom za usporedbu. Plavim bojama označene su populacije koje su uhvatile sve kromosome, a narančastim populacije sa gubitkom kromosoma.

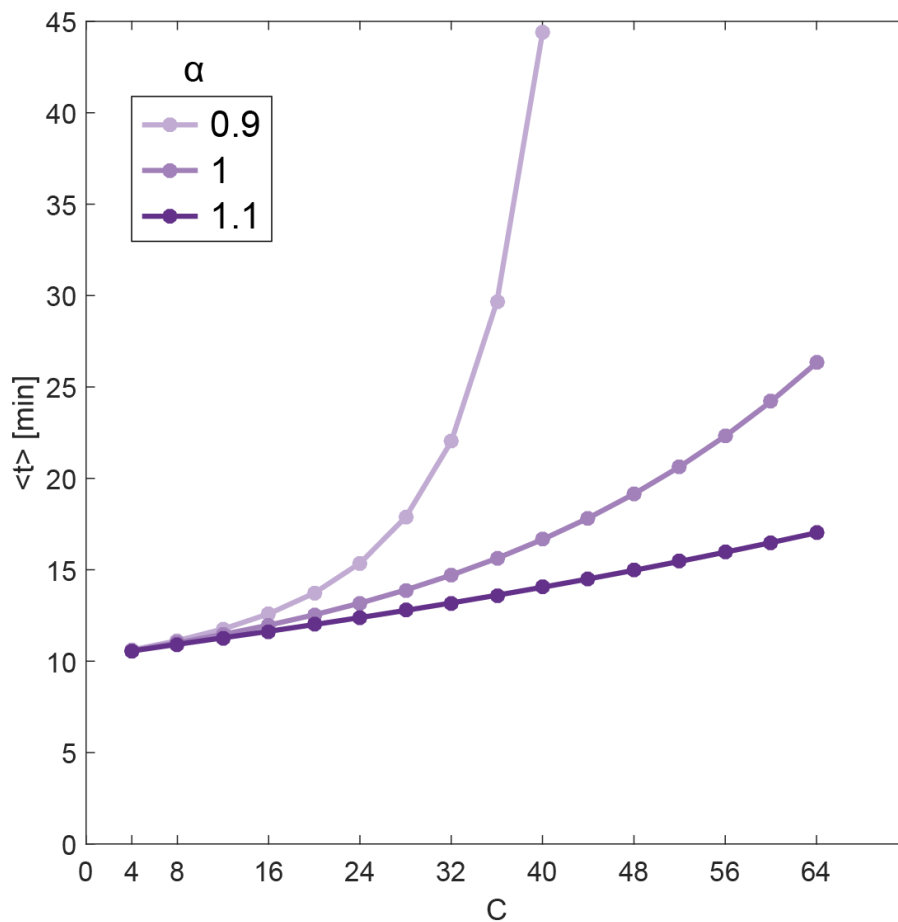
U anafazi je vidljivo slično zaostajanje udjela stanica sa većim brojem kromosoma (sl. 13). Također se može vidjeti utjecaj funkcije  $f(t)$ , oko  $t_0$ ; populacijama sa neuspješno uhvaćenim kromosomima značajno se usporav rast njihovog udjela. Kao i u slučaju rješenja za jedan kromosom, vrijednosti  $n_A$  i  $n_L$  asimptotski se približavaju graničnim vrijednostima, koje nisu iste za stanice sa različitim brojem kromosoma, već ukazuju na veći gubitak kromosoma kod stanica sa većim brojem kromosoma.

Populacije stanica sa većim brojem kromosoma kasnije ulaze u anafazu, vidljivo iz kasnijih vrhova u metafazi (sl. 11), većeg udjela stanica u prometafazi (sl. 12), i sporijeg rasta prema graničnoj vrijednosti u anafazi (sl. 13). Zaostajanje ovih populacija u ulasku u anafazu možda ukazuje da je populaciji stanica sa više kromosoma potrebno više vremena za uhvat svih kromosoma u prometafazi.



#### 4.4. Parametri modela

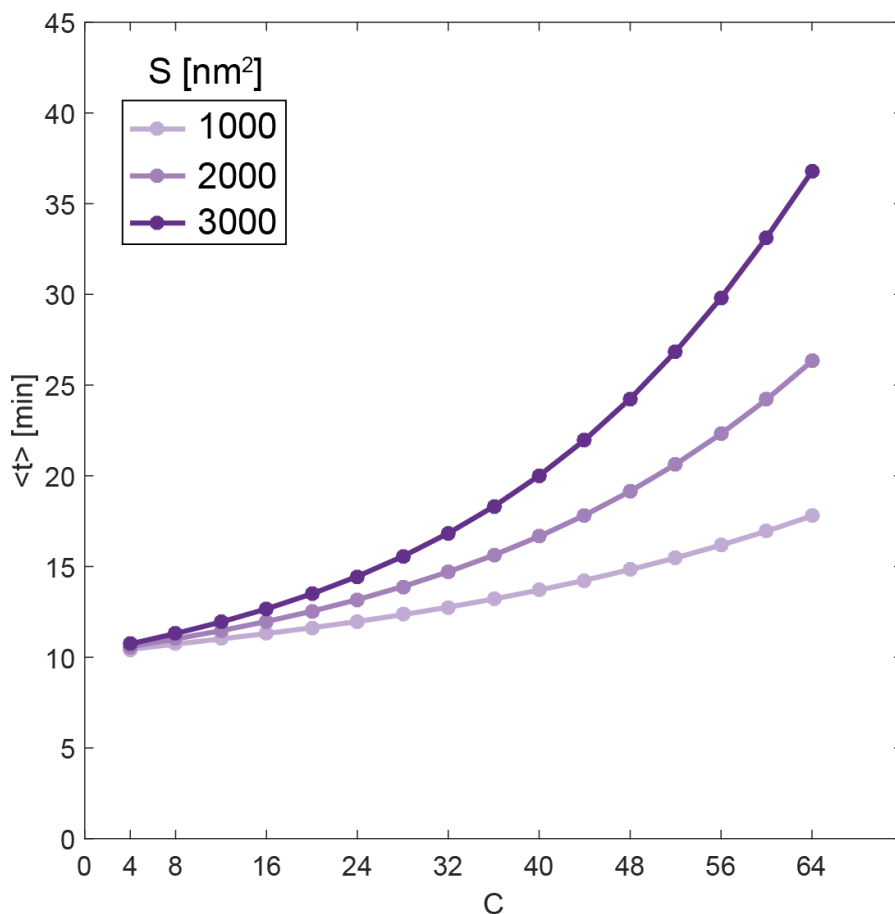
Kako bi ispitali moguće uzroke različitog gubitka kromosoma i trajanja metafaze za stanice sa različitim brojem kromosoma, promotrimo utjecaj promjene parametara na rješenja modela. Prosječno trajanje prometafaze i metafaze nazivamo trajanje formiranja diobenog vretena i definiramo ga kao  $\langle t \rangle = \int_0^1 t dn_A$ . Ovakom definirana vrijednost  $\langle t \rangle$  ovisi o ulasku stanica u anafazu, što označava kraj formacije diobenog vretena.



Slika 14. Trajanje formacije diobenog vretena  $\langle t \rangle$  u odnosu na broj kromosoma  $C$  te parametar  $\alpha$  - koji označava odnos broja mikrotubula i kromosoma (približno njihov omjer). Numerički račun je do 250 min.

Ako mjenjamo  $M$ , broj nukleacijskih mjesta iz kojih nukleiraju mikrotubuli, efektivno mjenjamo broj mikrotubula dostupnih za hvatanje kromosoma. Kako broj nukleacijskih mjesta raste sa brojem kromosoma u stanici, kao  $M = \alpha \cdot C + 4$ , ne mjenjamo direktno njihov broj, već ispitujeemo utjecaj omjera  $\alpha$  na  $\langle t \rangle$ . Za  $\alpha = 1$ , što je vrijednost korištena u ostatku modela, vidljivo je da trajanje formacije diobenog vretena raste sa povećanjem broja kromosoma te je za diploidnu stanicu 14.7 min, a tetraploidnu 26.31 min. Ako povećamo parametar na  $\alpha = 1.1$ , vrijednosti  $\langle t \rangle$  sporije raste, dakle stanice sa većim brojem mikrotubula brže formiraju diobeno vreteno nego one sa  $\alpha = 1$ . Ako smanjimo parameter na  $\alpha = 0.9$ , vidljivo je višestruko povećanje  $\langle t \rangle$  za populacije te se pojavljuje granična vrijednost broja kromosoma  $C = 40$ , nakon koje se diobeno vreteno više ne može uspješno formirati jer nema dovoljno mikrotubula za uhvat svih kromosoma. Ova granična vrijednost se može izračunati iz definicije za  $M$ , ako zahtjevamo  $M = C$ , što daje  $C_{MAX} = 4/(1 - \alpha)$ , tj.  $C_{MAX} = 40$  za  $\alpha = 0.9$ .

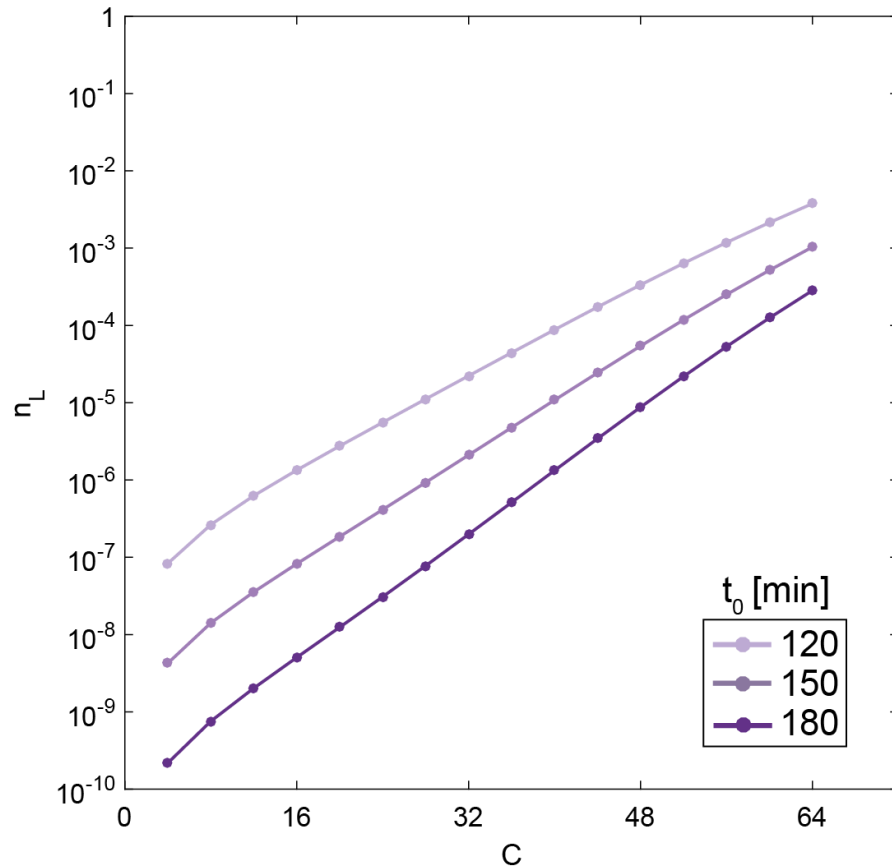
Za populacije stanica sa malim brojem kromosoma, razlika u  $\langle t \rangle$  nije tako izražena kao kod diploidnih ili tetraploidnih stanica. Ovaj efekt dolazi od konstante 4, koja je za mali broj kromosoma usporediva sa doprinosom broja kromosoma, dok je kod tetraploidnih stanica gotovo zanemariva. Populacije stanica sa malim brojem kromosoma stoga imaju usporedivi broj mikrotubula, što se odražava na usporedive vrijednosti  $\langle t \rangle$ .



Slika 15. Trajanje formacije diobenog vretena  $\langle t \rangle$  u odnosu na broj kromosoma  $C$  te parametar površine jednog nukleacijskog mjesta  $S$ . Numerički račun je do 250 min.

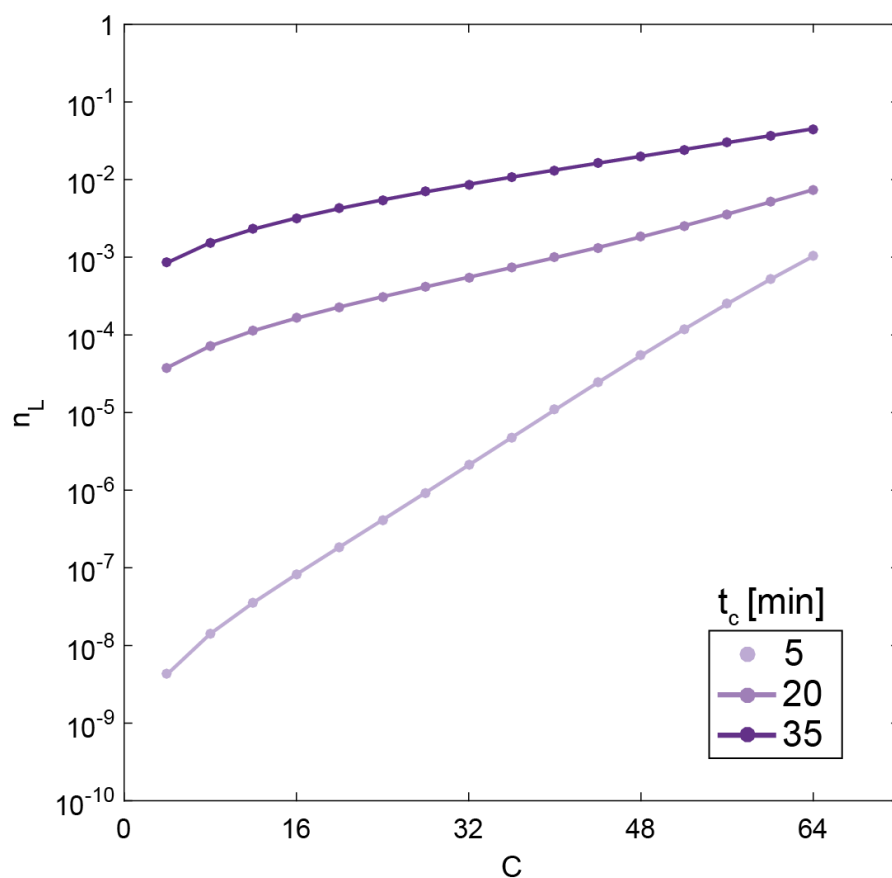
Utjecaj površine poprečnog presjeka diobenog vretena na vrijeme  $\langle t \rangle$  ispitano je mjenjanjem površine jednog nukleacijskog mjesta,  $S$ , prikazano na sl. 15. Diobeno vreteno *S. cerevisiae* je gotovo ravno, stoga je površina diobenog vretena približno ista površini SPB-a, koja je proporcionalna broju nukleacijskih mjesta  $M$  (odnosno broju kromosoma), te površini jednog nukleacijskog mjesta  $S$ . Slijedi da mjenjajući površinu nukleacijskog mjesta mjenjamo površinu poprečnog presjeka diobenog vretena. Za populacije stanica koje imaju približno ili manje od 32 kromosoma, utjecaj nije jako izražen, dok je kod tetraploidnih stanica razlika u trajanju formacije diobenog vremena veća od 5 min. Povećanjem površine  $S$  mikrotubuli moraju prebrisati veći prostor prije nego pronađu kinetohoru, stoga se smanjuje vjerojatnost  $p$  kontakta mikrotubula sa kromosomskim kinetohorama. Brzina uhvata kromosoma se smanjuje te populaciji stanica treba više vremena za formirati diobeno vreteno.

Kako nas u ovom radu primarno zanima gubitak kromosoma, ispitali smo utjecaj preskakanja SAC-a na udio stanica u anafazi koje nisu uspješno uhvatile sve kromosome,  $n_L$ . SAC je u modelu opisan funkcijom  $f(t)$ , sa parametarima  $t_0$  i  $t_c$  te su rezultati za različite vrijednosti ovih parametara prikazani redom na slikama 14 i 15.



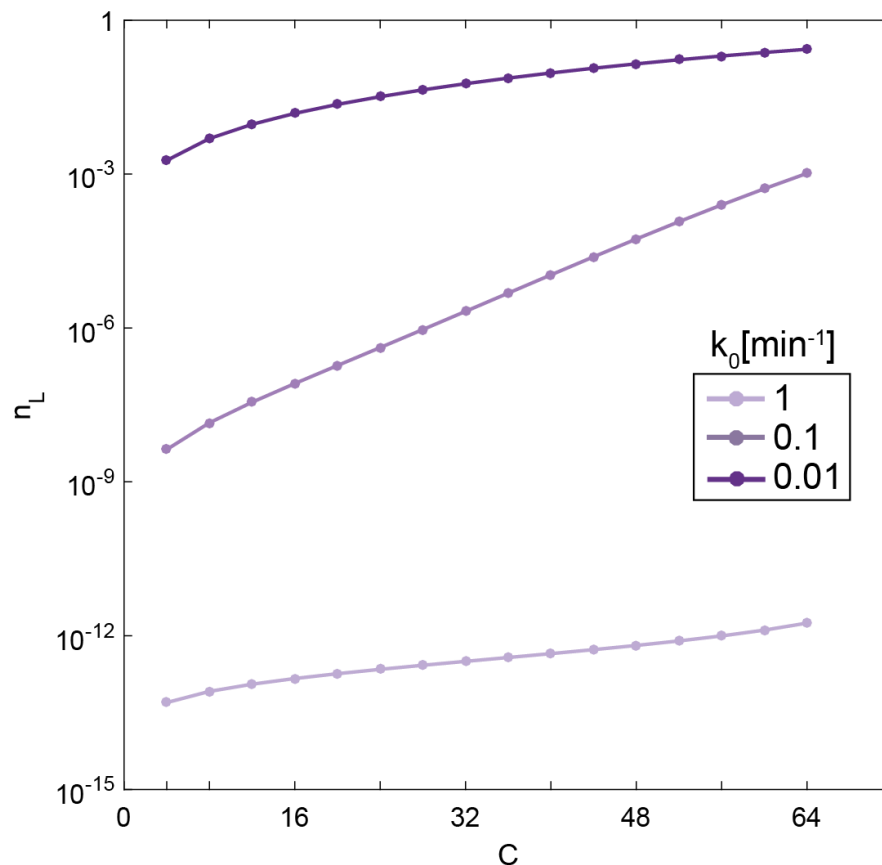
Slika 16. Ovisnost udjela stanica sa gubitkom kromosoma  $n_L$  o broju kromosoma  $C$  te vremenu preskakanja *spindle assembly checkpoint*-a  $t_0$ . Numerički račun je do 250 min.

Gubitak kromosoma smanjuje se sa povećanjem vremena preskakanja SAC-a, ali je utjecaj ovog parametra najizraženiji kod populacije stanica sa manjim brojem kromosoma, dok tetraploidne stanice imaju manju razliku gubitka kromosoma. Ako populacija stanica ima manje vremena do trenutka  $t_0$ , sve populacije stanica koje su još u prometafazi ne stignu u velikom broju pohvatati sve kromosome prije nego što odu u anafazu, što uzrokuje povećani broj stanica koje gube kromosome. Vidljivo je da je razlika između diploidnih i tetraploidnih stanica nekoliko redova veličine. Za  $t_0 = 150$  min ona je  $4.91 \cdot 10^2$ , što se slaže sa eksperimentalnim rezultatima.



Slika 17. Ovisnost udjela stanica sa gubitkom kromosoma  $n_L$  o broju kromosoma  $C$  te vremenu varijabilnosti efekta preskakanja *spindle assembly checkpoint*-a  $t_C$ . Numerički račun je do 250 min.

Promjena parametra  $t_C$  ima veliki utjecaj na stanice sa malim brojem kromosoma, ali za stanice sa velikim brojem razlika za drugačije vrijednosti parametra  $t_C$  je približno jedan red veličine. Uzrok tome je što stanice sa malim brojem kromosoma imaju dovoljno vremena da u velikom broju uspješno uhvate sve kromosome, a stanice sa puno kromosoma nemaju – stoga mala vrijednost  $t_C$  ne vodi do velikog gubitka kromosoma, dok za stanice sa većim vrijednostima  $t_C$  gubitak kromosoma značajno ovisi o vremenu koje imaju do SAC-a.



Slika 18. Ovisnost udjela stanica sa gubitkom kromosoma  $n_L$  o broju kromosoma  $C$  te brzini preskakanja stanica  $k_0$  kroz *spindle assembly checkpoint*. Numerički račun je pušten do 250 min.

Ako mjenjamo brinu preskakanja stanica kroz *spindle assembly checkpoint*, dobivamo za velike vrijednosti  $k_0$  male gubitke kromosoma, dok kod manjih vrijednosti, gubitci postaju veći. Parametar  $k_0$  ima sličnu, ali ne identičnu ulogu kao i  $t_0$  kod preskakivanja SAC-a, gdje mali parametar  $k_0$  odgovara velikom vremenu  $t_0$  i obratno. On također određuje brzinu uspješnog prijelaza stanica iz metafaze u anafazu te je konačni utjecaj ovog parametra kombinacija ovih dvaju navedenih efekata. Kao i kod ostalih parametara, također je uočljivo povećanje gubitaka sa povećanjem kromosoma.

## 5. Zaključak

Teorija prikazana u ovom radu novi je model koji opisuje diobu stanice i dinamiku između populacija stanica u raznim fazama mitoze. Koristili smo poznate mehanizme formiranja diobenog vretena i geometrije stanice kako bi promatrali udjele populacija u prometafazi, metafazi i anafazi te njihove promjene. Ovako postavljen model omogućio nam je ispitivanje gubitka kromosoma za stanice sa različitim brojem kromosoma. Uz realistične parametre za kvasac *S. cerevisiae*, ustanovili smo povećanje gubitaka kromosoma sa povećanjem broja kromosoma u stanici. Dobili smo povećanje od  $4.91 \cdot 10^2$  u gubitku kromosoma tokom podjele tetraploidnih stanica u usporedbi sa diploidnim (sl. 13 i 14), što čini moguće objašnjenje dosadašnjih eksperimentalnih rezultata [8-10]. Mora se napomenuti da je ova razlika dobivena za *in vitro* mjerene tetraploidne stanice, dok neke stanice iz prirode ne pokazuju ovako drastičnu razliku te bi valjalo iskoristiti eksperimentalna mjerenja te parametre modela kako bi ih objasnili.

Velike razlike u gubitku kromosoma pojavile su se kad smo mjenjali vrijeme preskoka *spindle assembly checkpoint*-a, što ukazuje na moguću važnost ovog mehanizma, koji još nije dobro istražen. Moguće objašnjenje je da je broj stanica, koje nisu imale dovoljno vremena da formiraju diobeno vreteno prije vremena preskoka SAC-a, značajno veći ako je trajanje formacije diobenog vretena za te stanice veliko (npr. umanjen broj nukleacijskih mjesta), ili ako je vrijeme preskakanja SAC-a za te stanice zbog nekog razloga manje (npr. mutacija), sl. 16.

Trajanje formiranja diobenog vretena pokazalo se vrlo osjetljivo na parametar  $\alpha < 1$ , sl. 14. Za stanice sa više kromosoma od određenog graničnog broja, dolazi do značajnog povećanja trajanje formiranja diobenog vretena te čak i nemogućnosti uspješnog formiranja kod populacija stanica sa brojem nukleiranih mikrotubula manjim od broja kinetohora. Kod normalne vrijednosti  $\alpha = 1$ , dobili smo vrijeme duljine trajanja formiranja diobenog vremena za diploidnu stanicu 14.7 min, a tetraploidnu 26.31 min, što odgovara realnim vrijednostima. Utjecaj geometrije stanica nije se pokazao značajan kao parametar  $\alpha$ , ali pokazuje nezanemarivo povećanje trajanja formiranja diobenog vremena sa povećanjem površine diobeong vretena i broja kromosoma koje treba uhvatiti.

U modelu imamo samo dvije vrste uhvata kromosoma: s jedne strane (*monotelic*), što dovodi do gubitka kromosoma i sa obje (*amphitelic*), što vodi na podjelu bez grešaka. U realnim stanicama postoje još i druge vrste vezanja koje vode na gubitak kromosoma te bi se mogle dodati u model. Model također ne razlikuje npr. haploidne stanice sa *C* kromosoma od diploidnih stanica sa *C* kromosoma, a nismo ni razlikovali pojedine kromosoma, koji su u prirodi drugačiji.

Uz preinake i unapređenja, ovaj model se može koristiti za različite vrste stanica, ispitivanje svojstava i procesa stanica tokom mitoze te čak i prilagodbu stanica na mutacije i okolinu. To možemo postići promatranjem više generacija stanica i mijenjajući neke od parametara iz generacije u generaciju.



## Literatura

- [1] Winey, M.; O'Toole, E.T. The spindle cycle in budding yeast. // *Nat Cell Biol.* 2001 Jan;3(1):E23-7.
- [2] Winey, M.; Bloom K. Mitotic spindle form and function. // *Genetics.* 2012 Apr;190(4):1197-224.
- [3] Hoyt M.A.; Totis L.; Roberts B.T. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. // *Cell.* 1991 Aug 9;66(3):507-17.
- [4] Rieder C.L.; Palazzo R.E. Colcemid and the mitotic cycle. // *J. Cell Sci.* 1992 Jul;102 ( Pt 3):387-92.
- [5] Rieder C.L.; Schultz A.; Cole R.; Sluder G. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. // *J. Cell Biol.* 1994 Dec;127(5):1301-10.
- [6] Rudner A.D.; Murray A.W. The spindle assembly checkpoint. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996 Dec;8(6):773-80.
- [7] Selmecki A.M.; Maruvka Y.E.; Richmond P.A.; Guillet M.; Shores N.; Sorenson A.L.; De S.; Kishony R.; Michor F.; Dowell R.; Pellman D. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. // *Nature.* 2015 Mar 19;519(7543):349-52.
- [8] Storchová Z.; Breneman A.; Cande J.; Dunn J.; Burbank K.; O'Toole E.; Pellman D. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. // *Nature.* 2006 Oct 5;443(7111):541-7.
- [9] Mayer V.W.; Aguilera A. High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mutat. Res.* 1990 Aug;231(2):177-86.
- [10] Andalis A.A.; Storchova Z.; Styles C.; Galitski T.; Pellman D.; Fink G.R. Defects arising from whole-genome duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics.* 2004 Jul;167(3):1109-21.
- [11] Gonen S.; Akiyoshi B.; Iadanza M.G.; Shi D.; Duggan N.; Biggins S.; Gonen T. The structure of purified kinetochores reveals multiple microtubule-attachment sites. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012 Sep;19(9):925-9
- [12] Vasileva V.; Gierlinski M.; Yue Z.; O'Reilly N.; Kitamura E.; Tanaka T.U. Molecular mechanisms facilitating the initial kinetochore encounter with spindle microtubules. // *J. Cell. Biol.* 2017 Jun 5;216(6):1609-1622.

- [13] Nannas N.J.; O'Toole E.T.; Winey M.; Murray A.W. Chromosomal attachments set length and microtubule number in the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle. // *Mol. Biol. Cell.* 2014 Dec 15; 25(25): 4034–4048.
- [14] O'Toole E.T.; Mastronarde D.N.; Giddings T.H. Jr.; Winey M.; Burke D.J.; McIntosh J.R. Three-dimensional analysis and ultrastructural design of mitotic spindles from the *cdc20* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Biol. Cell.* 1997 Jan;8(1):1-11.
- [15] Gay G.; Courtheoux T.; Reyes C.; Tournier S.; Gachet Y. A stochastic model of kinetochore-microtubule attachment accurately describes fission yeast chromosome segregation. // *J. Cell Biol.* 2012 Mar 19;196(6):757-74.