

Análise do fluxo dos microtubulos em direcção aos polos durante a divisão celular - Estimação e Interpretação

Mariana Cunha

Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

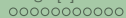
Seminário de Modelação
Coordenador: Prof. João Nuno Tavares

18 de Janeiro 2012

Mestrado em Engenharia Matemática
Orientador: Paulo Aguiar
Co-orientador: Helder Maiato

Sumário

- 1 Enquadramento na Biologia Celular
- 2 Apresentação do estudo: Yang, G., L.A. Cameron, P.S. Maddox, E.D. Salmon, and G. Danuser. 2008. Regional variation of microtubule flux reveals microtubule organization in the metaphase meiotic spindle. *J. Cell Biol.* 182:631-639.
- 3 Métodos desenvolvidos
- 4 Conclusões



Divisão Celular: Mitose - 1:2, Meiose 1:4

Divisão Celular: Mitose - 1:2, Meiose 1:4

Mitose (todas as células): célula diplóide $2N$ cromossomas origina duas novas células de $2N$ cromossomas cada ($2N + 2N$).

Miose (células germinais): célula diplóide $2N$ cromossomas origina quatro novas células de N cromossomas cada ($N + N + N + N$).

Divisão Celular: Mitose - 1:2, Meiose 1:4

Mitose (todas as células): célula diplóide $2N$ cromossomas origina duas novas células de $2N$ cromossomas cada ($2N + 2N$).

Meiose (células germinais): célula diplóide $2N$ cromossomas origina quatro novas células de N cromossomas cada ($N + N + N + N$).

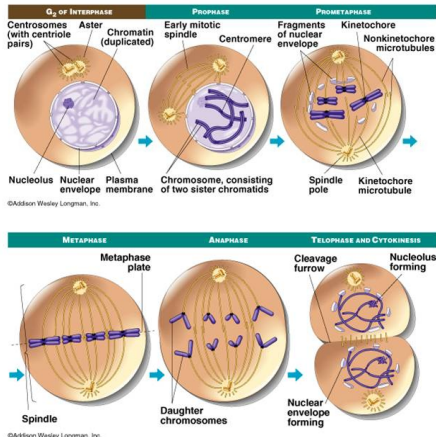


Fig. 1: Fases da mitose celular.

Divisão Celular: Mitose - 1:2, Meiose 1:4

Mitose (todas as células): célula diplóide $2N$ cromossomas origina duas novas células de $2N$ cromossomas cada ($2N + 2N$).

Meiose (células germinais): célula diplóide $2N$ cromossomas origina quatro novas células de N cromossomas cada ($N + N + N + N$).

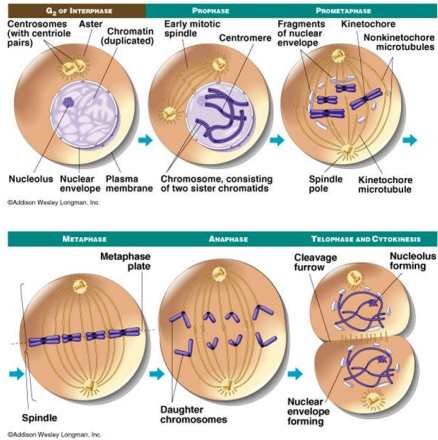


Fig. 1: Fases da mitose celular.

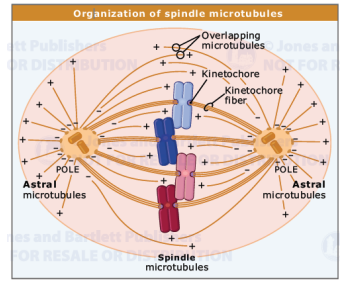


Fig. 2: Fuso mitótico.

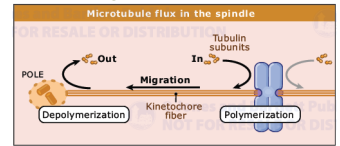


Fig. 3: Fluxo da tubulina.

Introdução e fusos de controlo

Objecto de estudo: Células de extratos de ovos de *Xenopus laevis*

Identificação de speckles:

- Análise quimográfica (Maddox et al., 2003a)
- Correlação cruzada na identificação de padrões de speckles (Miyamoto et al., 2004)
- Identificação individual

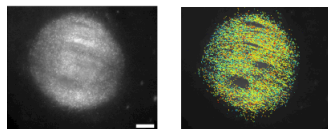


Fig. 4: [1]. Fig. 1 - Fuso meiótico de célula de *Xenopus laevis*. A, D. Bar, 10 μm

Introdução e fusos de controlo

Em fusos controlados:

$n = 66711$ trajetórias de 11 fusos

- $v = 2.56 \mu m$
- $\sigma = 0.61 \mu m/min$
- $\Delta v \simeq 0.11 \mu m/min$

Velocidade diminui $\sim 20\%$ nas zonas dos polos.

Taxas de fluxo nas regiões 1 - 2 e 22 - 23 significativamente diferentes da taxa de fluxo em 11 - 13. Utilizou-se um teste de hipóteses t-student sobre as médias, nível de significância $p = 0.001$, $t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{\sigma_x^2}{n_x} + \frac{\sigma_y^2}{n_y}}}$,

$n1 + n2 - 2$ graus de liberdade.

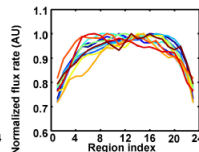
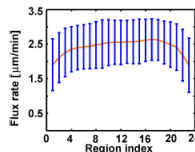
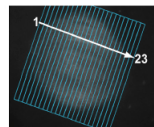
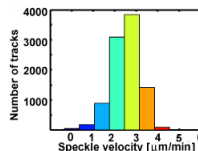
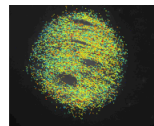
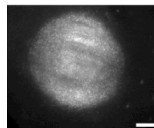


Fig. 5: [1]. Fig. 1 - Regional variation of poleward microtubule flux in control *Xenopus* egg extract spindles. A, D, E, F, G, H. Bar, 10 μm

Fusos de controlo

Factores possivelmente causadores de diminuição do fluxo nos polos:

- Geometria do fuso mitótico
- *Cinetocores* e centrossomas
- Complexo *Dynein/dynactin* e *kinesin-5*

Geometria do fuso mitótico

O efeito da projecção de três dimensões causaria também um decréscimo do desvio padrão das velocidades da tubulina, o que não se observou.

Seja N é o número de grupos de speckles, cada grupo relativo a uma velocidade média; V_i - velocidade média de cada grupo i ; c_i - peso relativo da velocidade do grupo i ; θ_i - variação do ângulo de curvatura dos microtubulos no grupo i .

- Velocidade média total dos speckles é dada por:

$$V = \sum_{i=1}^N c_i V_i,$$

- Assumindo que as velocidades de cada grupo, V_i , não estão correlacionadas: $\sigma^2(V) = \sum_{i=1}^N c_i^2 \sigma_i^2$

- $\sigma_p^2(V) = \sum_{i=1}^N c_i^2 \times \cos^2 \theta_i \times \sigma_i^2 < \sigma^2$

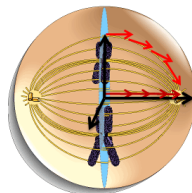


Fig. 6: Vectores de desvio padrão representados ao longo dos microtubulos.

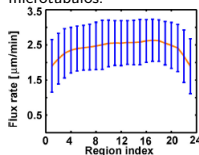


Fig. 7: [1]. Fig. 1 - Regional variation of poleward microtubule flux in control *Xenopus* egg extract spindles. G.

Inibição das *kinetochores* e dos centrossomas

Fusos com as *kinetochores* e os centrossomas inibidos (DNA marcado com esferas magnéticas)
 $n = 34.713$ trajectórias de 9 fusos diferentes

● $v = 2.75 \pm 0.75 \mu\text{min}$

● $\Delta v = 0.08 \mu\text{m}/\text{min}$

Velocidade diminui $\sim 20\%$ nas zonas dos polos.

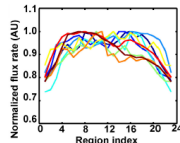
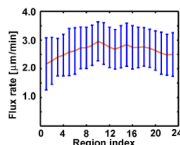
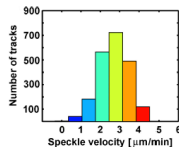
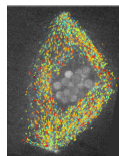


Fig. 8: [1] Fig. 2 - Regional variation of poleward microtubule flux in spindles assembled around plasmid DNA-coated beads. B, C, E, F.

Inibição do complexo *Dynein/dynactin* e *kinesin-5*

Fusos com p50/dynamitin em excesso:

$n = 23$, 768 trajectórias de 7 fusos

- $\hat{v} = 2.14 \mu\text{min}$
- $\hat{\sigma} = 0.58 \mu\text{m}/\text{min}$
- Não há variação regional do fluxo significativa.

(Concordante com Burbank et. al (2007))

Fusos com *kinesin-5* inibida:

- Administração de várias quantidades de monastrol: 20 a 40 μM , 50 a 150 μM , > 150 μM
- Não há variação regional do fluxo significativa em nenhum dos casos. (Contradição com Burbank et. al (2007))

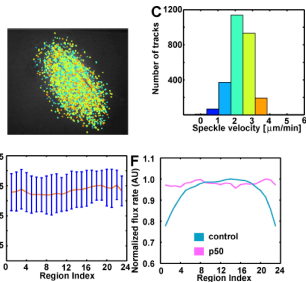


Fig. 9: [1]. Fig 3 - Inhibition of dynein/dynactin, kinesin-5 or both suppresses regional variation of poleward microtubule flux. B, C, E, F.

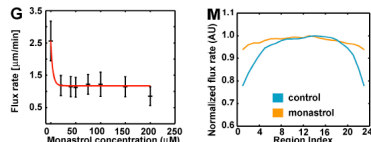


Fig. 10: [1]. Fig 3 - Inhibition of dynein/dynactin, kinesin-5 or both suppresses regional variation of poleward microtubule flux. G, M.

Inibição do complexo *Dynein/dynactin* e *kinesin-5*

Fusos com p50/dynamitin em excesso e 200 μM monastrol:

$n = 26,018$ trajectórias de 6 fusos

● $v = 1.59 \pm 0.39 \mu \text{ min}$

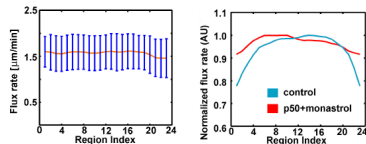


Fig. 11: [1]. Fig 3 - Inhibition of dynein/dynactin, kinesin-5 or both suppresses regional variation of poleward microtubule flux. R, S.

Assim, um mecanismo de fluxo baseado na tração dos polos não é suficiente par explicar a variação regional de fluxo. O complexo *Dynein/dynactin* e *kinesin-5* parecem provocar em simultâneo a diminuição do fluxo da tubulina na zona dos polos.

Análise estatística da distribuição da velocidade

Testes à normalidade das distribuições das velocidades:

- ▷ Lilliefors, Anderson-Darling, Shapiro-Francia (*R*-project, Nortest package)

Para testar nos dados grupos com diferentes distribuições de velocidade:

- ▷ Método baseado em **Fraley and Raftery** (2002) (*R*-project, MCLUST package)
Contudo: Este método determina, através de optimização, simultaneamente o número de modelos e os respectivos parâmetros óptimos (média e desvio padrão) utilizando o BIC

$$BIC = 2 \log L_M(x, \hat{\theta}) - m_M \log(n)$$

x \equiv amostra aleatória

$L_M(x, \hat{\theta})$ \equiv estimador de máx. veros. para o modelo,

$\hat{\theta}$ \equiv vector de parâmetros óptimos do modelo,

m_M \equiv número de parâmetros independentes do modelo,

n \equiv tamanho da amostra (núm. de trajectórias identificadas)

Aplicação do teste considerando até 9 modelos de distribuições diferentes para os dados.

Testes de normalidade

Table S1. BIC values for mode analysis of speckle velocity distributions in control spindles

Spindle ID	Normality test p-value	BIC		
		Rank = first	Rank = second	Rank = third
Spindle 01	5.27×10^{-70}	-1.0922×10^4 <i>n</i> = 2	-1.0942×10^4 <i>n</i> = 3	-1.1117×10^4 <i>n</i> = 1
Spindle 02	6.58×10^{-16}	-1.0470×10^4 <i>n</i> = 2	-1.0489×10^4 <i>n</i> = 3	-1.0526×10^4 <i>n</i> = 1
Spindle 03	1.27×10^{-52}	-9.5237×10^3 <i>n</i> = 2	-9.5352×10^3 <i>n</i> = 3	-9.6831×10^4 <i>n</i> = 1
Spindle 04	6.11×10^{-62}	-9.3871×10^3 <i>n</i> = 3	-9.4030×10^3 <i>n</i> = 2	-9.5902×10^4 <i>n</i> = 1
Spindle 05	1.36×10^{-25}	-1.0931×10^4 <i>n</i> = 2	-1.0944×10^4 <i>n</i> = 3	-1.1047×10^4 <i>n</i> = 1
Spindle 06	8.74×10^{-18}	-9.7100×10^3 <i>n</i> = 2	-9.7294×10^3 <i>n</i> = 3	-9.7846×10^3 <i>n</i> = 1
Spindle 07	1.18×10^{-15}	-8.5460×10^3 <i>n</i> = 2	-8.5640×10^3 <i>n</i> = 3	-8.6080×10^3 <i>n</i> = 1
Spindle 08	7.17×10^{-21}	-8.7255×10^3 <i>n</i> = 2	-8.7327×10^3 <i>n</i> = 3	-8.8183×10^3 <i>n</i> = 1
Spindle 09	5.53×10^{-16}	-4.0002×10^3 <i>n</i> = 2	-4.0166×10^3 <i>n</i> = 3	-4.0586×10^3 <i>n</i> = 1
Spindle 10	7.06×10^{-24}	-4.5195×10^3 <i>n</i> = 2	-4.5293×10^3 <i>n</i> = 3	-4.6188×10^3 <i>n</i> = 1
Spindle 11	5.96×10^{-16}	-6.4017×10^3 <i>n</i> = 2	-6.4070×10^3 <i>n</i> = 3	-6.4593×10^3 <i>n</i> = 1

n denotes the number of modes fitted.

Análise de clusters e Combinação de distribuições

Análise de Clusters

Para as 23 regiões do fuso efectuou-se análise de clusters afim de prever o número de modelos de velocidade para cada uma.

Tabela 1: Análise de clusters para 2 distribuições de velocidade.

Fusos	2 modelos de velocidade
Controlo ($n = 11$)	~ 90%
Complexo <i>Dynein/dynactin</i> inibido ($n = 7$) <i>Kinesin-5</i> inibida ($n = 17$)	< 20%
Complexo <i>Dynein/dynactin</i> e <i>kinsin-5</i> inibidos ($n = 6$)	

Análise de clusters e Combinação de distribuições

Análise de Clusters

Para as 23 regiões do fuso efectuou-se análise de clusters afim de prever o número de modelos de velocidade para cada uma.

Tabela 1: Análise de clusters para 2 distribuições de velocidade.

Fusos	2 modelos de velocidade
Controlo ($n = 11$)	$\sim 90\%$
Complexo <i>Dynein/dynactin</i> inibido ($n = 7$) <i>Kinesin-5</i> inibida ($n = 17$)	$< 20\%$
Complexo <i>Dynein/dynactin</i> e <i>kinsin-5</i> inibidos ($n = 6$)	

Combinação de distribuições para cada região

Para cada banda i , $i = 1, \dots, 23$, para cada v temos o parâmetro $P_i(v) = P(X \leq v)$ que é a função de distribuição cumulativa dos speckles na banda i , X amostra aleatória.

Análise de clusters e Combinação de distribuições

Análise de Clusters

Para as 23 regiões do fuso efectuou-se análise de clusters afim de prever o número de modelos de velocidade para cada uma.

Tabela 1: Análise de clusters para 2 distribuições de velocidade.

Fusos	2 modelos de velocidade
Controlo ($n = 11$)	$\sim 90\%$
Complexo <i>Dynein/dynactin</i> inibido ($n = 7$) <i>Kinesin-5</i> inibida ($n = 17$)	$< 20\%$
Complexo <i>Dynein/dynactin</i> e <i>kinsin-5</i> inibidos ($n = 6$)	

Combinação de distribuições para cada região

Para cada banda i , $i = 1, \dots, 23$, para cada v temos o parâmetro $P_i(v) = P(X \leq v)$ que é a função de distribuição cumulativa dos speckles na banda i , X amostra aleatória.

$D_k(v, \mu_k, \sigma_k) = \int_0^v \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_k} e^{-\frac{(v-\mu_k)^2}{2\sigma_k^2}} dv$, $k = 1, \dots, K$, em que K representa o número de modelos de distribuição de velocidade ($K=2$ em fusos de controlo e DNA-beaded fusos). O peso relativo a dar a uma distribuição na banda i , c_1 ($c_2 = 1 - c_1$), é calculado minimizando o erro:

$$e_i = \int_0^{v_{max}} (P_i(v) - \sum_{k=1}^K c_k D_k(v, \mu_k, \sigma_k))^2 dv,$$

em que v_{max} é o limite superior das velocidades dos speckles.

Distribuições de velocidade

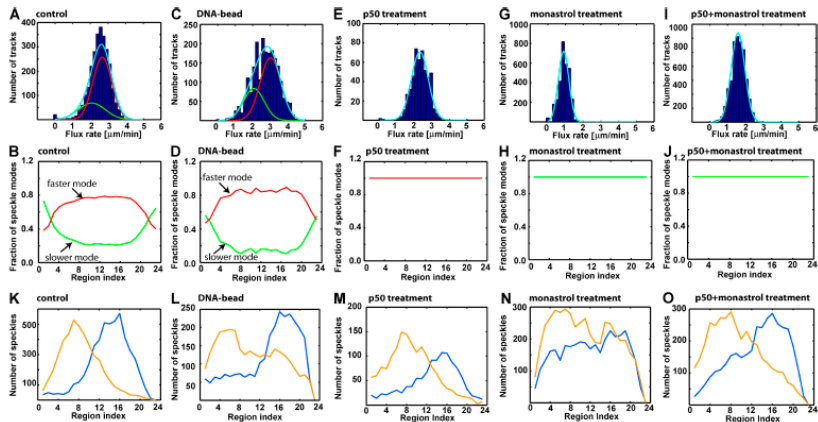


Fig. 12: [1]. Fig. 4 **Organização espacial dos microtubulos do fuso (A,C,E,G e I)** Análise de modelos de distribuição para as velocidade de fluxo de modelos individuais representativos de vários fusos. **(I)** Vermelho, modelo rápido; verde, modelo lento; ciano, mistura de ambos. **(B, D, F, H, and J)** Contribuição regional dos modelos de velocidades. (B; $n = 11$), (D; $n = 9$), (F; $n = 7$), (H; $n = 7$), (J; $n = 6$). **(K-O)** Distribuição espacial das ocorrências de speckles no fusos analisados em A,C,E,G e I. Laranja, speckles movendo-se para o polo da esquerda; azul, speckles movendo-se para o polo da direita.

Arquitetura do fuso

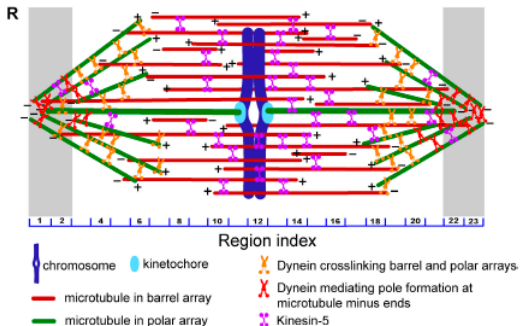


Fig. 13: [1]. Fig. 4 **Organização espacial dos microtubulos do fuso (R)** Modelo: dois conjuntos de microtubulos ligados aos polos de fluxo lento (verde) estão dinamicamente acoplados via proteínas motoras a um conjunto de microtubulos de polaridade antiparalelos e de velocidade superior (vermelho). As bandas cinzentas representam as regiões 1-2 e 22-23 definem, respectivamente, o polo esquerdo e o polo direito na análise efectuada.

Drosophila S2

Objecto: Células de *Drosophila* S2 em que a tubulina está ligada a uma molécula fluorescente (GFP).

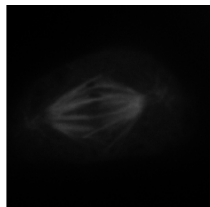


Fig. 14: Fuso mitótico de célula de *Drosophila* S2. IBMC

Problema: Os microtúbulos (MTs) têm um nível de fluorescência uniforme;
Inconvenientes:

- i) impede a observação da dinâmica longitudinal dos MTs
- ii) obscurece os processos de substituição dos MTs que acontecem a todo o momento.

Objectivo: Interessa-nos quantificar o fluxo e tempo característico de turnover; verificar se há diminuição do fluxo ao nível dos polos.

Conformal Mapping

Estabelecer invariâncias

- Rotação
- Ajuste de escala

Conformal mapping

Hipótese: O fuso mitótico apresenta, projectado a 2D, forma elipsoidal

- Projectar cada microtubulo a 1D

$$(x_1, y_1) \longrightarrow \frac{x_1^2}{a^2} + \frac{y_1^2}{b^2} = 1 \longrightarrow (a, y_1)$$
- Interpolação nas linhas

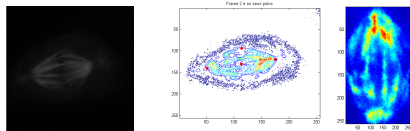


Fig. 15: Fuso mitótico de célula de *Drosophila S2* (IBM). Fuso visualizado através do comando `contour()` (Matlab). Fuso rodado e centrado na elipse (Matlab).

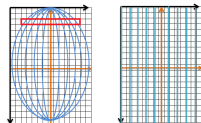


Fig. 16: Ilustração de conformal mapping elipse-retângulo.

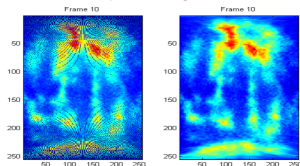


Fig. 17: Fuso mitótico de célula de *Drosophila S2* (IBM) após conformal mapping. Fuso anterior após interpolação.

Cálculo da velocidade

Função de correlação cruzada (1 dim):

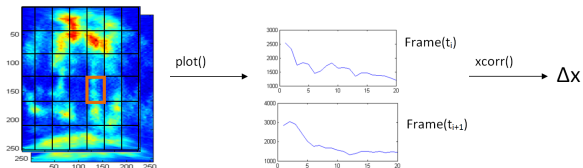


Fig. 18: Esquema do cálculo do deslocamento entre dois frames utilizando correlação cruzada no Matlab.

$$\text{(contínuo)} \quad ACorr(f, g) = h(\Delta x) = \int_{-\inf}^{+\inf} f(x - \Delta x) \cdot g(x) dx$$

$$\text{(discreto)} \quad ACorr(f, g) = h(\Delta x) = \sum_{\Delta x=l}^{2l} f(x - \Delta x) \cdot g(x) dx \rightarrow \text{Max}(h) \rightarrow \hat{\Delta x}$$

Função de correlação cruzada (n dim):

$$\text{(discreto)} \quad ACorr(f_1, \dots, f_n) = h(v) = \sum_{x-t_i \cdot v=l}^{2l} \prod_{i=1}^n f_i(x - t_i \cdot v) \\ \rightarrow \text{Max}(h) \rightarrow \hat{v}$$

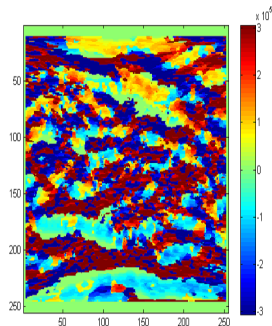


Fig. 19: Mapa de velocidades obtido no Matlab.

Conclusões

- Apesar de as imagens obtidas terem bastante ruído, os métodos que têm vindo a ser desenvolvidos têm tido em conta esse factor afim de virem a ser robustos a ruído.
- Há fortes indícios de que o fluxo da tubulina diminui na zona dos polos.
- Possivelmente as velocidades dos speckles no fuso seguem dois tipos de distribuição.
- Numa análise de correlação cruzada não é necessário haver identificação individual de speckles, e portanto os algoritmos deste método podem ser aplicados a um número muito superior de fusos e de tipos de células.
- Os resultados do estudo no artigo estão limitados à *Xenopus-laevis*.

Referências

[1] Regional variation of microtubule flux reveals microtubule organization in the metaphase meiotic spindle. Ge Yang, Lisa A. Cameron, Paul S. Maddox, Edward D. Salmon, and Gaudenz Danuser *J Cell Biol* 2008 182:631-639. Published August 18, 2008.

[2] Lewin's Cells, Lynne Cassimeris, Vishwanath R. Lingappa, George Plopper, Jones and Bartlett Publishers

[3] *J. Cell Biol.*, Vol. 186, No. 1. (13 July 2009), pp. 11-26.

[4] Theory of cross-correlation analysis of PIV images. Richard D. Keane and Ronald J. Adrian. *APPLIED SCIENTIFIC RESEARCH* Volume 49, Number 3, 191-215, DOI: 10.1007/BF00384623