

# Analiza dinamike proteina Rac1 tijekom staničnog kretanja

---

Šoštar, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:457625>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Marko Šoštar

# **Analiza dinamike proteina Rac1 tijekom staničnog kretanja**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Igor Weber

Prof. dr. sc. Nenad Pavin

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Science

Marko Šoštar

# **A study of Rac1 dynamics in cell motility**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:  
Prof. Igor Weber, PhD  
Prof. Nenad Pavin, PhD

Zagreb, 2022

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za staničnu dinamiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Igora Webera i prof. dr. sc. Nenada Pavina, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biofizike pri Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## INFORMACIJE O MENTORIMA

Igor Weber rođen je 1963. godine u Varaždinu, a osnovnu i srednju školu (MIOC) pohađao je u Zagrebu. Diplomirao je 1988. godine na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Akademski stupanj magistra znanosti iz područja biofizike također je stekao na Sveučilištu u Zagrebu 1991. godine. Doktorsku disertaciju obranio je 1995. godine na Tehničkom sveučilištu u Münchenu. Od 1988. do 1992. radi kao asistent na Zavodu za biofiziku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 1992. do 1995. godine bio je doktorand na Tehničkom sveučilištu u Münchenu, a na Max-Planck institutu za biokemiju u Martinsriedu radi najprije kao postdoktorand (1996.), a nakon toga kao znanstveni suradnik (1997.-2002.). Na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta "Ruđer Bošković" zaposlio se kao znanstveni suradnik (2002.-2005.), a zatim radi redom kao viši znanstveni suradnik (2005.-2009.), znanstveni savjetnik (2009.-2014.), te znanstveni savjetnik u trajnom izboru (2014.-). Znanstveni opus dr. sc. Igora Webera obuhvaća više od 60 znanstvenih radova u znanstvenim časopisima te poglavlja u knjigama i enciklopedijskim izdanjima, koji su citirani više od 2200 puta. Posebno se ističu radovi objavljeni u vrhunskim časopisima poput Journal of Cell Biology, EMBO Journal, Current Biology, Current Opinion in Cell Biology, Science, Nature Communications i Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Navedene publikacije predstavljaju značajan doprinos istraživanju strukture, dinamike i funkcije aktinskog citoskeleta metodama biofizike, biofotonike i molekularne biologije. Vodio je projekte Ministarstva znanosti RH, fondacije UKF, Nacionalnih zaklada za znanost Republike Hrvatske i Švicarske, kao i brojne bilateralne projekte s Njemačkom, Slovenijom i Austrijom. Sudjeluje u nastavi na diplomskim i poslijediplomskim doktorskim studijima Fizike, Biologije i Biofizike na Sveučilištima u Zagrebu i Splitu, gdje je izabran u naslovna zvanja redovitog profesora, a bio je i voditelj 5 diplomskih i 5 doktorskih radova. Održao je tridesetak pozvanih predavanja na međunarodnim znanstvenim skupovima i institucijama u zemlji i inozemstvu. Bio je recenzent za više od 10 uglednih znanstvenih časopisa, te za projekte Nacionalne zaklade za znanost RH i Medical Research Council UK. Aktivan je član Hrvatskog mikroskopijskog društva (predsjednik 2012.-2016.), Hrvatskog društva za teorijsku i matematičku biologiju (predsjednik 2004.-2006.), Hrvatskog biofizičkog društva (član upravnog odbora 2006.-2014.) i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju. Član je Izvršnog odbora Europskog mikroskopijskog društva (2016.-). Obnašao je dužnost predstojnika Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković (2005.-2016.), bio je pomoćnik ravnatelja IRB za znanost i obrazovanje (2013.-2014.), te član Upravnog vijeća IRB (2016.-). Osnivač je i voditelj

Laboratorija za staničnu dinamiku (2021.-), kao i servisa za konfokalnu mikroskopiju (2005.-) na IRB. Bio je član organizacijskih, znanstvenih i savjetodavnih odbora mnogobrojnih konferencija iz područja mikroskopije i biofizike, kao i predsjedavajući organizator skupova 13. Multinational Congress on Microscopy u Rovinju i 17. Annual Meeting of European Light Microscopy Initiative u Dubrovniku, oba održana 2017. godine s više od 400 sudionika. Član je Povjerenstva za znanstvene skupove i znanstvene udruge MZO RH od 2004. godine.

Nenad Pavin rođen je 05.05.1967. u Rijeci. Osnovnoškolsko obrazovanje započinje 1974. g. u Rijeci, a završava ga 1982. u Zadru, gdje također 1986. g. završava i srednju školu. Potom upisuje studij fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu gdje 1993. g. stječe zvanje diplomirani inženjer fizike te potom upisuje poslijediplomski studij gdje 1998. g. stječe zvanje magistar fizike. Doktorsku disertaciju izrađuje pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Vladimira Paara na istom fakultetu, naslova „Kaotični tranzijenti u novoj populacijskoj jednadžbi s rupom i njihov odraz na fraktalnu strukturu Arnoldovih jezika", te ju brani 1999. g. Profesionalnu karijeru započinje na Fizičkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, gdje od 1993.-2001. g. radi kao znanstveni novak na problemima iz teorije kaosa te se od 2001.g. na istom odsjeku zapošljava kao docent. Na znanstveno usavršavanje na Max Planck Institutu za fiziku kompleksnih sustava u Dresdenu odlazi 2007. g. gdje 4 godine boravi kao gost-znanstvenik kod prof. dr. sc. Franka Jülichera. Za vrijeme tog boravka svoj znanstveni interes proširuje na proučavanje fizikalnih procesa važnih u razumijevanju stanične biologije. Ukupno je objavio 54 znanstvena rada od toga 49 u časopisima koji su zastupljeni u Current contents (CC). Među njima se ističu radovi objavljeni u časopisima velikom faktora utjecaja: Cell – 2 rada (IF 33.116), Nature Cell Biology (IF 20.058) – 1 rad, Nature Communications – 2 rada (IF 12.124), Annual Review of Biophysics – 1 rad (IF 10.676), Developmental Cell – 2 rada (IF 9.174), Current Biology – 1 rad (IF 10.834), Cell Reports – 1 rad (IF 9.995), Physical Review Letters – 2 rada (IF 7.645). Pod njegovim stručnim vodstvom izrađeno je 5 doktorskih disertacija te 10 diplomskih radova. Održao je više od 25 predavanja na međunarodnim znanstvenim skupovima i znanstvenim institutima. Kao voditelj ili suradnik, sudjelovao je u izvođenju niza projekata uključujući projekte koji se trenutno izvode: ERC Synergy „Molecular origins of aneuploidies in healthy and diseased human tissues (Aneuploidy)" (iznos: 10,000,000 EUR), projekt Hrvatske zaklade za znanost (iznos: 1,000,000 HRK), projekt Znanstveni centar izvrsnosti za kvantne i kompleksne sustave te reprezentacije Liejevih

algebri (iznos: 36.956.624,09 HRK). Dobitnik je (1) Državne nagrade za znanost za 2015. godinu, (2) Godišnje nagrade za istaknutu znanstvenu djelatnost zaposlenika u znanstvenim ili znanstveno-nastavnim zvanjima PMFa (2022), (3) Nagrade Europskog društva za mikroskopiju za izvanredan članak u kategoriji znanosti o životu: "The mitotic spindle is chiral due to torques within microtubule bundles", M. Novak, B. Polak, J. 78 Simunić, Z. Boban, B. Kuzmić, A. Thomae, I.M. Tolić, N. Pavin, Nat Commun 2018, na kojem je Nenad Pavin glavni seniorski istraživač. U nastavi je sudjelovao održavanjem predavanja za 7 predmeta na dodiplomskom studiju te 2 predmeta na poslijediplomskom studiju te vježbi na nizu predmeta; bio je voditelj smjera Biofizika na doktorskom studiju fizike; sudjelovao je u pripremi i operacionalizaciji novog studijskog smjera "Profesor fizike i informatike" (pokrenutog 2000. g.), a čiji je voditelj bio od 2000.-2005. g.

## SAŽETAK

Male GTPaze iz obitelji Rho predstavljaju skupinu signalnih proteina odgovornih za regulaciju i koordinaciju brojnih staničnih aktivnosti vođenih aktinskim citoskeletom. Među eukariotskim stanicama, amebe *Dictyostelium discoideum* se najbrže spontano repolariziraju, te su sposobne u roku od 30 sekundi potpuno preokrenuti orijentaciju. Kao takve, one predstavljaju osnovni poligon za ispitivanje konceptualnih modela koji povezuju male GTPaze i njihove signalne puteve s morfodinamikom stanica tijekom migracije. U *D. discoideum*, aktivni Rac1 regulira aktinske polimeraze na prednjem kraju i proteine koji usnopljuju aktinske niti na zadnjem kraju polariziranih stanica. Dinamiku aktivnosti Rac1 pratili smo koristeći specifičnu fluorescentnu sondu, i uz nepravilne obrasce, također uočili pojavu pravilnih obrazaca, u obliku stabilne polarizacije, te putujućih i stojnih valova. Proveli smo sistematsku analizu reakcijsko-difuzijskih modela srednjeg polja čije reakcije slijede zakon o djelovanju masa, te identificirali minimalni model koji može reproducirati navedene pravilne obrasce. Odgovarajući model iskoristili smo za opis dinamike proteina Rac1 i njegove ciljne molekule DGAP1. Osim što je uspješno reproducirao pojedinačne značajke eksperimentalno opaženih dinamičkih obrazaca fluorescentno obilježenih Rac1 i DGAP1, model je također reproducirao predominantno negativnu prostorno-vremensku korelaciju između tih proteina. Uz spomenuti model srednjeg polja, također smo razvili odgovarajući stohastički model kako bismo proučili utjecaj nasumičnih fluktuacija na ponašanje ovog sustava, te smo ustanovili njihovu ključnu ulogu u spontanim prelascima između različitih tipova obrazaca promatranih proteina.



## ABSTRACT

Small GTPases from the Rho family represent a group of signaling proteins responsible for the regulation and coordination of numerous cellular activities guided by the actin cytoskeleton. Among eukaryotic cells, *Dictyostelium discoideum* amoebas are capable of the fastest reorganization of the actin network, and can reverse their polarity within one minute. As such, they represent a basic testing ground for conceptual models linking small GTPases and their signaling pathways to cell morphodynamics during migration. In *D. discoideum*, active Rac1 regulates actin polymerases at the leading edge and actin filament-bundling proteins at the trailing end of polarized cells. We monitored the spatio-temporal distribution of Rac1 activity using a specific fluorescent probe, and in addition to irregular patterns, we also observed the appearance of regular patterns, in the form of stable polarization, as well as traveling and standing waves. We conducted a systematic analysis of mean field reaction-diffusion models with reactions that follow the law of mass action, and identified a minimal model that can reproduce the observed regular patterns. We used a variant of this model to describe the dynamics of Rac1 GTPase and its effector protein DGAP1. Besides successfully reproducing individual features of the experimentally observed dynamic patterns of fluorescently labeled proteins, the model also reproduced the predominantly negative spatio-temporal correlation between Rac1 and DGAP1. In addition to the mean field model, we developed a stochastic model in order to analyze the impact of random fluctuations on the behavior of the system, and established their key role in spontaneous transitions between different types of protein patterns.

## EXTENDED ABSTRACT

In highly motile cells such as neutrophils, phagocytes, and *Dictyostelium discoideum* amoebae, local functional domains within the actin cytoskeleton are being continually assembled and disassembled at a high rate. In order to coordinate these processes, the upstream signaling mechanisms must operate with high spatial and temporal precision. To gain insight into these signaling networks, it is important to investigate the dynamics of their components *in vivo*. This can be achieved by combining live-cell imaging of proteins' signaling activity with theoretical simulations of the network dynamics, and comparing the results obtained by the two approaches. One of the most intensely studied groups of signaling proteins in this context are small GTP hydrolases from the Rho family (Rho GTPases, e.g., Rac, Rho, and Cdc42), which are well established as master regulators of the actin cytoskeleton (Heasman and Ridley, 2008). Nevertheless, dynamics of the Rho GTPase activity and the underlying regulatory mechanisms are still insufficiently understood.

In their activated, GTP-bound state, Rho GTPases bind to, and thereby activate their effector proteins: e.g., actin-binding proteins, actin polymerases, and their direct regulators. For instance, Rac interacts with proteins that promote actin polymerization such as Scar/WAVE and formins, whereas Rho regulates myosin II-mediated contractility (Ridley and Hall, 1992; Ridley *et al.*, 1992; Eden *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010).

*D. discoideum* cells represent a well-suited model system for studying these signaling pathways since they share many Rho GTPase-dependent signaling mechanisms with mammalian cells (Filić *et al.*, 2021). This applies in particular to the three *Dictyostelium* Rac1 isoforms, which share 90% sequence identity with the human Rac1, and a 100% identical nucleotide-binding domain (Filić *et al.*, 2021). In *D. discoideum*, Rac1 interacts with a number of proteins involved in remodeling of the cortical actin network (Rivero and Somesh, 2002; Filić *et al.*, 2012, 2014). At the protruding leading edge of polarized motile cells Rac1-GTP binds to and activates proteins from the WASP family, and thereby promotes branched actin polymerization mediated by Arp2/3. The non-protruding regions of the cellular cortex are stabilized by the proteins that cross-link and bundle actin filaments, such as cortexillins I and II. The bundling activity of cortexillins depends on the formation of a complex with the IQGAP-related protein DGAP1, which is catalyzed by activated Rac1 (Faix *et al.*, 2001). Rac1 is, therefore, apparently involved in the regulation of antagonistic processes that induce formation of disparate actin-based structures (Filić *et al.*, 2012, 2014).

In order to monitor the activity of Rac1, we used *D. discoideum* cells that express a probe composed of the GBD domain from DPAKa kinase fused to yellow fluorescent protein, which binds specifically to the active form of Rac1A (DPAKa(GBD)-DYFP) (Marinović *et al.*, 2016). Additionally, in order to assess the influence of DGAP1 on spatio-temporal distribution of Rac1, we monitored the dynamics of DGAP1 tagged with red fluorescent protein (DGAP1-mRFP). We found that active Rac1 is predominantly located at the membrane, where it forms regular or random patterns that typically last several minutes. We observed regular patterns in roughly 30% of the monitored cell population, while the patterns in the remaining cells were classified as random. Regular patterns can be divided into three main categories: traveling waves (rotations), standing waves (oscillations), and stationary inhomogeneous distributions (polarizations). In the vast majority of cases, the signals of DPAKa(GBD)-DYFP and DGAP1-mRFP in these patterns were anticorrelated, which agrees with the published opposite localization of the two probes during cell migration (Filić *et al.*, 2012, 2014). However, we noted several cases in which the localizations of the two probes coincided, i.e., both probes were accumulated at the front end of polarized cells.

In order to gain better understanding of the observed patterns, we decided to use mathematical modeling. We started by developing abstract mathematical models that belong to the class of mass conserved reaction-diffusion models and in which chemical reactions are subject to the law of mass action, taking into consideration only linear and bilinear reactions. By using linear stability analysis, we show that a simple two-component model is not capable of generating any sustainable pattern. Next, we show that a three-component model can generate stable polarized states with one clearly defined polar zone, and transient multipolar states with several different areas with increased concentration competing for mass, until only one area remains as the "winner". However, we found no stable oscillatory patterns resulting from the three-component model. In the next step, we analyzed a four-component system in which two components can be bound together into a complex. Through linear stability analysis and numerical simulations, we determined the existence of both stationary and oscillatory patterns, thereby establishing a class of minimal models capable of capturing the essential observed dynamical properties of Rac1 activity. After considering generally formulated reaction-diffusion models with a small number of components, we constructed a model that describes the dynamics of both Rac1 and its effector DGAP1. The model consists of two parts, i.e., of two interconnected reaction cycles: (i) cycle that describes interaction between Rac1 and its negative regulator GAP, and (ii) cycle that describes interaction between Rac1 and DGAP1. Cycle (i) is completely based on the aforementioned four-component model, while

cycle (ii) is based on a slightly modified version of that model, characterized by a negative regulation of DGAP1, in which the DGAP1 molecule is forced to leave the membrane after interacting with active Rac1. This type of interaction proved to be essential for reproducing predominantly negatively correlated distributions of Rac1 and DGAP1 in oscillatory patterns.

In order to relate the experimentally and theoretically obtained patterns, we compared the kymographs of the measured signal of the probe for active Rac1 in the membrane, DPAKa(GBD)-DYFP, and the linear concentration of Rac1-GTP calculated by the model. The simulation results were in good agreement with experimentally observed Rac1 activity patterns and their characteristic periods and wave profiles. In addition to the typical basic patterns, the model also successfully reproduced observed transitions between different regular patterns, such as the transition from oscillations to rotations, and from clockwise to counterclockwise rotations. Furthermore, we analysed the temporal evolution of the fluorescence intensity of Rac1 and DGAP1 probes in the phase plane. Rac1 and DGAP1 signals delineate a phase portrait of a characteristic crescent shape, in which evolution proceeds in a counterclockwise direction. This shape of the phase portrait is a consequence of a predominantly negative correlation between Rac1 and DGAP1 distributions in oscillatory patterns, where Rac1 leads and DGAP1 follows behind. Notably, simulations generated an almost identical crescent-shaped phase portrait.

Finally, to elucidate how and why cells divide their time into periods of ordered and random movement, we developed a special method for quantifying the regularity of patterns, which is based on the concept of symmetropy (a mathematical term that combines the properties of symmetry and entropy), and compared these results with the results of the corresponding analysis of the stochastic version of our Rac1-DGAP1 reaction-diffusion model. As expected, the symmetropy analysis of experimental data showed that disordered patterns appear with the highest probability. From this, we infer that cells reside most of the time in the region of the parameter space in which simulations of the mean field model result in states with spatially homogeneous protein distributions. Indeed, stochastic simulations show that random fluctuations prevent complete relaxation to an equilibrium state, and promote the appearance of shorter-lived patterns in areas where we do not expect a pattern to appear. Thus, the low level of pattern regularity in freely moving cells is determined by specific parameter values, which appear as if avoiding the region of the parameter space in which cells would be trapped in a strictly defined behavior mode.

# SADRŽAJ

|          |                                                                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>UVOD .....</b>                                                                                | <b>1</b>  |
| 1.1      | Kretanje eukariotskih stanica i aktinski citoskelet .....                                        | 1         |
| 1.2      | Male GTPaze iz obitelji Rho i njihovi ciljni proteini.....                                       | 5         |
| 1.3      | Modelni organizam: <i>Dictyostelium discoideum</i> .....                                         | 8         |
| 1.4      | <i>D. discoideum</i> Rac1 i ciljni proteini.....                                                 | 10        |
| 1.5      | Polarnost, oscilacije, modeli, i mehanizmi povratne sprege .....                                 | 14        |
| <b>2</b> | <b>METODE .....</b>                                                                              | <b>18</b> |
| 2.1      | Mikroskopija i obrada slika.....                                                                 | 18        |
| 2.2      | Analiza glavnih komponenti .....                                                                 | 19        |
| 2.3      | Simetrija i entropija obrazaca - simetropija .....                                               | 21        |
| 2.4      | Reakcijsko-difuzijske jednačbe.....                                                              | 24        |
| 2.5      | Linearna analiza stabilnosti.....                                                                | 25        |
| 2.6      | Numeričke simulacije.....                                                                        | 29        |
| 2.7      | Stohastičko modeliranje .....                                                                    | 29        |
| <b>3</b> | <b>REZULTATI.....</b>                                                                            | <b>36</b> |
| 3.1      | Rac1-GTP stvara pravilne obrasce u membrani stanice.....                                         | 36        |
| 3.2      | Obrasci Rac1-GTP i DGAP1 pretežno su antikorelirani .....                                        | 38        |
| 3.3      | Dvokomponentni model (Model I) .....                                                             | 39        |
| 3.4      | Trokomponentni model (Model II) .....                                                            | 44        |
| 3.5      | Četverokomponentni model (Model III).....                                                        | 51        |
| 3.6      | Rac1-DGAP1 model .....                                                                           | 57        |
| 3.7      | Prostorno-vremenska raspodjela aktivnosti Rac1: usporedba eksperimenata i rezultata modela ..... | 62        |
| 3.8      | Fazni odnos između aktivnog Rac1 i DGAP1 .....                                                   | 65        |

|          |                                                                               |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.9      | Simetropija i usporedba eksperimenata s rezultatima stohastičkog modela ..... | 67        |
| 3.10     | Vrijednosti parametara Rac1-DGAP1 modela.....                                 | 70        |
| <b>4</b> | <b>DISKUSIJA I ZAKLJUČAK .....</b>                                            | <b>73</b> |
| <b>5</b> | <b>POPIS LITERATURE .....</b>                                                 | <b>79</b> |



# 1 UVOD

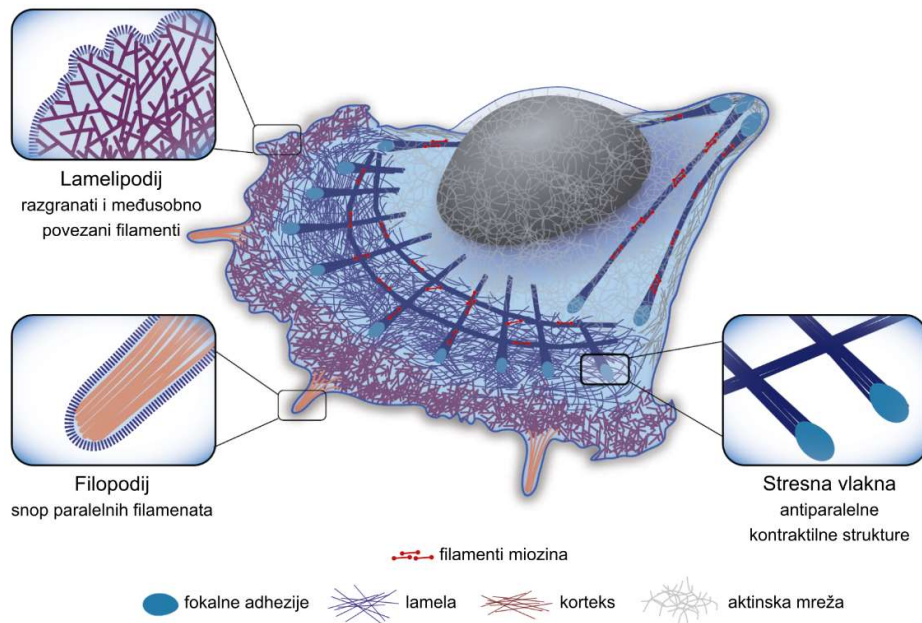
## 1.1 Kretanje eukariotskih stanica i aktinski citoskelet

Sposobnost kretanja jedna je od najosnovnijih funkcija eukariotskih stanica, a bazira se na kompleksnoj samoorganizirajućoj mehanokemijskoj mašineriji sastavljenoj od citoskeletnih filamenata i molekularnih motora (Slika 1-1). Ta je mreža izuzetno dinamična, ali i sposobna za vrlo preciznu organizaciju u prostoru i vremenu. Ugrubo, postoje dva osnovna načina staničnog kretanja: plivanje i puzanje. U tekućem mediju stanice se obično kreću plivajući, koristeći cilije ili flagele, dok se puzanjem kreću stanice koje žive na čvrstim podlogama. Puzanje se najčešće proučava postavljajući stanice na umjetnu dvodimenzionalnu podlogu poput površine pokrovnog stakalca. Kretanje po takvoj podlozi zahtjeva koordiniranu aktivnost citoskeleta, membrane i sustava za adheziju, te se tipično konceptualizira kao ciklički proces, sastavljen od četiri koraka (Lauffenburger and Horwitz, 1996). U prvom koraku dolazi do rasta aktinskih filamenata koji guraju membranu te time stvaraju protruzije (filopodije, lamelipodije, i pseudopodije) u smjeru kretanja. Drugi korak čini formiranje novih adhezija na prednjem kraju, čime se uravnotežuju propulzivne i kontraktilne sile, te tako omogućuju glatko, kontinuirano kretanje stanice (Geiger *et al.*, 2001). U trećem se koraku adhezije na stražnjem kraju razgrađuju i otpuštaju od podloge, dok u zadnjem, četvrtom koraku, molekularni motori miozini uzrokuju kontrakciju, odnosno povlačenje stražnjeg kraja. Ameboidno puzanje koriste različiti tipovi stanica, često u različite svrhe. Amebe se kreću kroz zemljano tlo u potrazi za hranom, dok u životinjama slično kretanje neutrofila i makrofaga omogućuje učinkovitu obranu od infekcija. Usmjereno gibanje fibroblasta esencijalno je za brzo zatvaranje rana, a programirano kretanje tijekom razvoja embrija odgovorno je za preraspodjelu slojeva tkiva i umrežavanje živčanog sustava. Stanična pokretljivost također ima značajnu ulogu u patološkim procesima, primjerice u metastatskom širenju karcinoma, te u razvoju kroničnih upalnih bolesti.

Svi navedeni procesi mogući su zahvaljujući silama koje generira aktinski citoskelet. Osnovna komponenta aktinskog citoskeleta su aktinski filamenti, odnosno polarni linearni polimeri citoplazmatskog proteina aktina (Pollard and Cooper, 2009). Aktinski filamenti prolaze kroz kontinuirani proces sastavljanja i rastavljanja, čime se aktinske strukture remodeliraju i prilagođavaju trenutačnim potrebama (Letort *et al.*, 2015). Usmjerenost sile koju uzrokuje polimerizacija aktina proizlazi iz strukturalne polarnosti aktinskih filamenata (Huxley, 1963), kod kojih jedan, tupi ili (+) kraj polimerizira brže od drugog, ušiljenog ili (-)



kraja. Brzorastući (+) kraj koristi se za guranje tereta, a cijepanje i depolimerizacija odvijaju se bliže (-) kraju, čime se oslobađaju monomeri za recikliranje. U filopodijima se aktinski filamenti organiziraju u paralelne svežnjeve, dok u lamelipodijima i pseudopodijima dolazi do nastanka razgranatih mreža koje mogu proizvesti velike sile guranja i stanicama služe kao glavni pokretači prednjeg kraja prema naprijed. Pseudopodiji se pojavljuju kod vrlo pokretljivih stanica ( $\sim 10 \mu\text{m}/\text{min}$ ), i uključuju relativno slabe interakcije s podlogom, dok je formiranje lamelipodija karakteristično za sporije, mezenhimalno kretanje ( $\sim 1 \mu\text{m}/\text{min}$ ), koje se tipično oslanja na snažne i specifične adhezije (Fritz-Laylin, Lord and Mullins, 2017; Titus and Goodson, 2017). Pseudopodiji i lamelipodiji također se morfološki razlikuju: pseudopodiji su trodimenzionalne (3D) strukture, dok su lamelipodiji plosnate, dvodimenzionalne (2D) membranske ekstenzije. Ovakve fenotipske razlike upućuju na postojanje do sada slabo istraženih razlika u mehanizmima na kojima se temelji stvaranje ovih različitih protruzivnih struktura.



Slika 1-1. **Organizacija aktina u reprezentativnim stanicama nalik fibroblastima.** Shematski prikaz glavnih aktinskih struktura: 1. Lamelipodij - protruzija na prednjem kraju stanice sačinjena od guste, razgranate mreže aktina. 2. Filopodij - tanki izdanak stanične membrane popunjen paralelnim aktinskim filamenatima. 3. Stresna vlakna - dinamička kontraktorna struktura sastavljena od antiparalelnih aktinskih filamenata povezanih miozinom. Preuzeto i prilagođeno iz (Letort *et al.*, 2015).

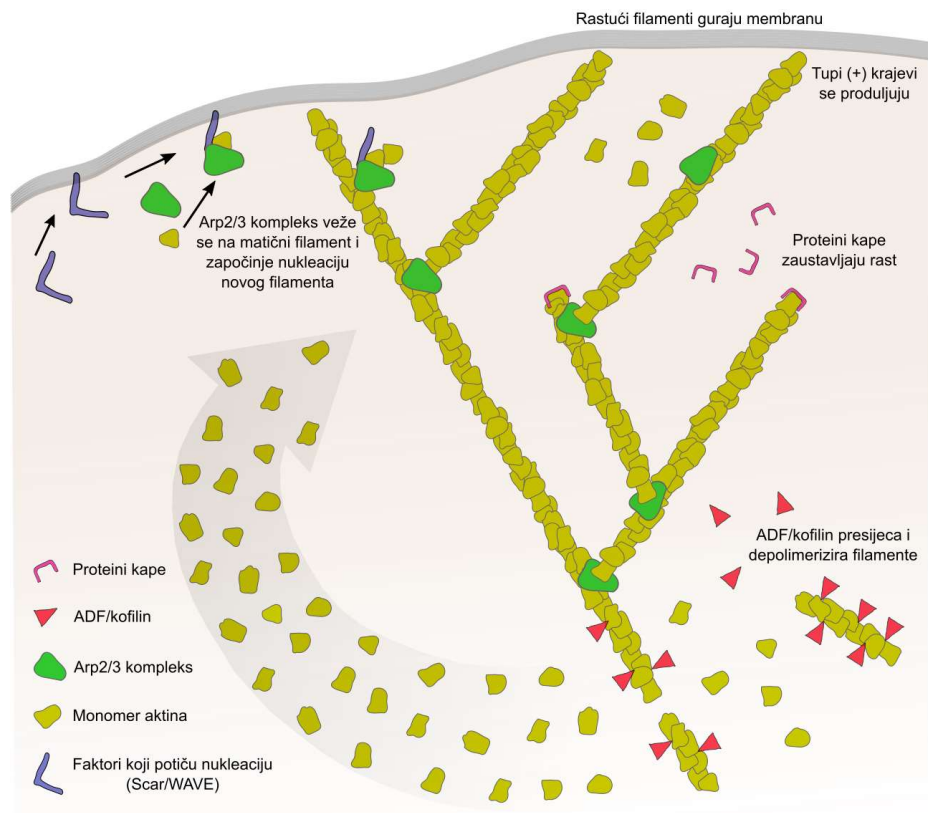
Istraživanja strukture aktinske mreže u lamelipodijima pomoću elektronske mikroskopije otkrila su da na bočnim stranama već postojećih "matičnih" filamenata dolazi do nukleacije novih filamenata pod kutem od  $\sim 70^\circ$  (Svitkina *et al.*, 1997; Mullins, Heuser and

Pollard, 1998), u procesu koji se naziva dendritička nukleacija (Slika 1-2). Novonastali filamenti nastavljaju se produljivati i guraju membranu stanice mehanizmom Brownovog ili termalnog zapinjača (*eng. Brownian ratchet*) (Peskin, Odell and Oster, 1993; Mogilner and Oster, 1996). Nakon kratkog perioda elongacije, na njihove plus krajeve sjedaju proteini-kape (*eng. capping proteins*) i zaustavljaju daljnji rast. Rastavljanje mreže odvija se pomoću kombinacije odvajanja grana i presijecanja aktinskih filamenata na fragmente, te konačno depolimerizacijom fragmenata. Mehanizam nastajanja protruzija baziran na dendritičkoj nukleaciji ima značajne prednosti u odnosu na kontinuiranu elongaciju individualnih filamenata. Kratki, kruti slobodni krajevi filamenata efikasniji su u generiranju sila jer se ne svijaju, a uporište u matičnoj mreži omogućuje im učinkovitiju transformaciju energije polimerizacije u koristan rad. Također, repetitivno grananje u kojem je moguće prilagođavati brzine i mjesta nukleacije značajno olakšava širenje i reorijentaciju mreže.

Molekularna mašinerija koja kontrolira protruzije dendritičkih mreža uključuje velik broj nužnih te pomoćnih molekula. Osim samog aktina, komponente nužne za odvijanje tog procesa su kompleks Arp2/3, proteini-kape i ADF/kofilin. Kompleks Arp2/3 nukleira filamente-kćeri pod kutem od  $\sim 70^\circ$  u odnosu na matični filament, a ima i ulogu poveznice ta dva filamena. Da bi nukleirao novu granu, Arp2/3 se mora aktivirati i vezati za matični filament. Aktiviraju ga faktori koji potiču nukleaciju (*eng. nucleation-promoting factors*), a koji uglavnom pripadaju obitelji WASP (*eng. Wiskott-Aldrich syndrome protein*), i uključuju proteine Scar/WAVE, WASP i N-WASP (Machesky *et al.*, 1999; Burianek and Soderling, 2013). Stalna proizvodnja novih filamenata zahtijeva i istodobno zaustavljanje rasta postojećih filamenata kako bi se spriječila eksponencijalna ekspanzija mreže i neproduktivna potrošnja monomera. Taj zadatak obavljaju proteini-kape: Eps8, gelsolin, CapZ i cap32/34. Za rastavljanje razgranate aktinske mreže prvenstveno je zadužen ADF/kofilin, koji mijenja konformaciju matičnog filamena i tako reducira njegov afinitet za vezanje kompleksa Arp2/3 (Chan, Beltzner and Pollard, 2009).

Osim sila guranja u protruzijama, aktinski citoskelet generira i vučne sile međusobnim klizanjem filamenata aktina i miozina, kao što je izvorno ustanovljeno proučavanjem mišićnih stanica (Huxley and Hanson, 1954; Weber and Franzini-Armstrong, 2002). Miozini, pripadnici velike superfamilije motornih proteina, koriste energiju hidrolize ATP-a za kretanje uzduž aktinskih filamenata (Sweeney and Holzbaur, 2018). Miozini klase II specifično su dizajnirani za kontrakciju mišića. Miozin II polimerizira u bipolarne filamente koji vuku aktinske filamente i tako dovode do kontrakcije osnovne građevne jedinice mišićnih vlakana,

sarkomere. Sastavljanje tih filamenata u drugim tipovima stanica je reverzibilno, što im omogućuje uspostavu kontraktilnog sustava tamo gdje je to u određenom času potrebno. U pokretnim stanicama, kontraktilne sile koje proizvode stresna vlakna tipično djeluju na fokalne adhezije, što dovodi do njihovog puknuća i posljedično do povlačenja ruba stanice. Alternativno, ove sile mogu i ojačati novonastale fokalne adhezije, koje onda služe kao uporište za stvaranje novog ciklusa protruzija. Kod usmjerenog kretanja, ojačanje adhezija tipično se odvija na prednjem kraju, dok se razgradnja adhezija predominantno odvija na stražnjem kraju stanice. Takva asimetrija pomaže stanicama održavati smjer kretanja.



Slika 1-2. **Stvaranje razgranate mreže aktina.** Aktivacijom kompleksa Arp2/3 i vezanjem za matični filament započinje nukleacija novog filameta, koji gura membranu prema naprijed. Neograničeni rast filamenata sprječavaju proteini kape, a cijepanje i depolimerizaciju filamenata obavlja ADF/kofilin, te tako oslobađa monomere za recikliranje. Prilagođeno prema (Pollard and Cooper, 2009).

Da bi proizveli sile, filamenti aktina i miozina II ne moraju nužno biti poravnati, kao što su primjerice u stresnim vlaknima, već mogu biti posloženi u mrežu u kojoj su individualni filamenti orijentirani pod različitim kutovima (Verkhovsky, Svitkina and Borisov, 1999). U migrirajućim stanicama, interakcija dva kraja bipolarnog filameta miozina II s dva aktinska filameta orijentirana pod različitim kutovima uzrokuje rotaciju filamenata aktina i miozina II

oko sidrišnih točaka dok se svi ne poravnaju. Takvo poravnanje filamenata praćeno je kontrakcijom mreže u ortogonalnom smjeru. U stanicama koje se brzo kreću, kao što su keratociti i neutrofili, kontrakcija mreže aktinskih i miozinskih filamenata pomiče stražnji kraj stanice prema naprijed, tako da on prati napredujući prednji kraj (Svitkina *et al.*, 1997). Moguće je da takva kontrakcija neuređene aktinsko-miozinske mreže predstavlja primordijalni mehanizam za generiranje vučnih sila, koji je kasnije evoluirao u učinkovitije kontraktilne sustave, kao što su stresna vlakna, kontraktilni prstenovi i sarkomere.

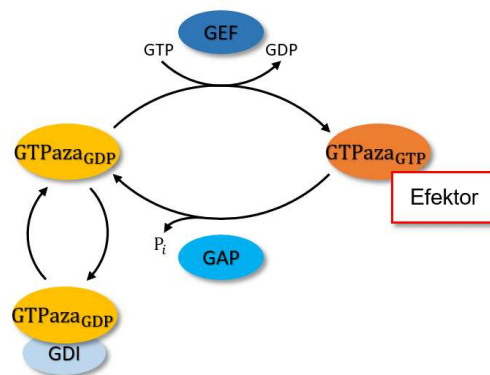
Kortikalni aktinski citoskelet definira mehanička svojstva površine stanice, te pruža stanicama zaštitu od vanjskih sila, a može i regulirati unutarstanični tlak (Salbreux *et al.* 2012). Prilikom oštećenja aktinskog korteksa ili njegovog odvajanja od membrane, unutarnji tlak može uzrokovati stvaranje sferičnih ispupčenja membrane, tzv. mjehurića (*eng. blebs*). Ponovna izgradnja aktinskog korteksa na membrani mjehurića te njegova kontrakcija dovodi do uvlačenja mjehurića. Mjehurići se često stvaraju tijekom apoptoze gdje nastaju kao prekursori apoptotskih tijela. Također se često pojavljuju tijekom citokineze, pri čemu omogućuju smanjenje prekomjernog tlaka u stanicama kćerima. Nadalje, ameboidno kretanje stanica u prostorno ograničenom okruženju popraćeno je opsežnim stvaranjem mjehurića (Liu *et al.*, 2015; Ruprecht *et al.*, 2015), koji u tom slučaju pomiču prednji kraj stanice umjesto lamelipodija i filopodija (Charras and Paluch, 2008).

## 1.2 Male GTPaze iz obitelji Rho i njihovi ciljni proteini

Male Rho GTPaze predstavljaju skupinu proteina koji su najpoznatiji po svojim ulogama u regulaciji reorganizacije citoskeleta, pokretljivosti stanica, stanične polarnosti, transporta vezikula i staničnog ciklusa (Heasman and Ridley, 2008). Promjene u signalizaciji Rho GTPaza doprinose malignim transformacijama, neurološkim abnormalnostima i imunološkim bolestima.

Većina Rho GTPaza ciklički mijenja svoje stanje između aktivne konformacije, kada su vezane za GTP (gvanozin-trifosfat), i neaktivne konformacije, kada su vezane za GDP (gvanozin-difosfat) (Slika 1-3). Ovu izmjenu reguliraju tri vrste proteina. Faktori koji potiču izmjenu nukleotida (*eng. guanine nucleotide exchange factors*, GEFs), kataliziraju zamjenu GDP-a za GTP, čime se Rho GTPaza prevodi u aktivni oblik, dok proteini koji aktiviraju hidroliznu aktivnost GTPaze (*eng. GTPase activating proteins*, GAPs) prevode GTPazu u neaktivni oblik (Rossman, Der and Sondek, 2005; Bos, Rehmann and Wittinghofer, 2007).

Faktori koji inhibiraju disocijaciju GDP-a i Rho GTPaze (*eng. GDP-dissociation inhibitors, GDIs*) vežu se za neaktivni oblik GTPaze te ju ekstrahiraju iz membrane u citosol i tako sprečavaju njezinu aktivaciju pomoću GEF proteina (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Garcia-Mata, Boulter and Burridge, 2011). U aktivnoj konformaciji u kojoj su vezane za GTP, Rho GTPaze stupaju u interakciju s nizom ciljnih (efektornih) proteina, uključujući kinaze, regulatore aktina, formine, članove obitelji WASP, te druge *potporne* proteine koji djeluju kao platforme za stvaranje proteinskih kompleksa (*eng. scaffold proteins*). Jedna te ista Rho GTPaza može pokrenuti niz staničnih procesa, ovisno o lokalizaciji, podražaju i tipu stanice. Prostorno-vremenska regulacija svake Rho GTPaze je stoga važna za određivanje ishoda njezine aktivnosti.



Slika 1-3. **Osnovni ciklus regulacije malih GTPaza.** GTPaza kruži između GTP-vezanog, aktivnog stanja, i GDP-vezanog, neaktivnog stanja. Proteini GEF potiču zamjenu GDP-a za GTP, dok se deaktivacija odvija uz pomoć proteina GAP. Za dovođenje GTPaze na membranu i ekstrakciju s membrane u citosol zaduženi su proteini GDI.

Do sada je identificirano više od 80 GEF proteina i više od 70 GAP proteina u humanim stanicama (Hall, 2012), što sugerira da je regulacija GTPaza iz obitelji Rho složena i da se njihova aktivnost i lokalizacija mogu modulariti mnoštvom signalnih putova ovisno o prostorno-vremenskom kontekstu. Napomenimo da, osim tipičnih GTPaza koje izmjenjuju svoje stanje između aktivnog i neaktivnog, postoje i GTPaze koje nisu regulirane ciklusom izmjene vezanja za GTP i GDP. Na primjer, neke od njih su konstitutivno vezane za GTP i regulirane alternativnim mehanizmima poput posttranslacijskih modifikacija.

Koncept uključenosti Rho GTPaza u preuređenje stanične arhitekture tijekom migracije u 2D okruženjima izgrađen je na značajnim otkrićima Halla, Ridleyjeve i Nobesa, koji su pokazali da Rho GTPaza Rac potiče stvaranje lamelipodija kao odgovor na stimulaciju pomoću citokina PDGF (*eng. Platelet-derived growth factor*), (Ridley *et al.*, 1992), dok RhoA stimulira stvaranje kontraktilnih, tzv. stresnih, aktomiozinskih vlakana (Ridley and Hall, 1992). Kasnije

se pokazalo da treća kanonska Rho GTPaza Cdc42 potiče rast filopodija i dodatno aktivira Rac (Nobes and Hall, 1995). Rac potiče stvaranje lamelipodija vezanjem na dvije komponente pentamernog regulatornog kompleksa SCAR/Wave, Sra1 i WAVE1. Naime, ta interakcija generira konformacijsku promjenu u kompleksu i razotkriva VCA motiv u proteinu WAVE1, te tako omogućuje vezanje kompleksa na Arp2/3 i njegovu aktivaciju (Eden *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010), čime se pak potiče dendritička polimerizacija aktina i protruzija stanične membrane. Uz Rac, aktivaciju Arp2/3 kompleksa može potaknuti i Cdc42 kroz vezanje i aktivaciju proteina N-WASP (Rohatgi *et al.*, 1999). Zanimljivo, pokazano je da inhibicija aktivacije Arp2/3 ovisne o SCAR/Wave, postignuta utišavanjem ekspresije komponenata SCAR/Wave kompleksa Sra1 i Nap1, inhibira kretanje u 2D, ali potiče 3D invaziju, što ukazuje da različiti mehanizmi reguliraju kretanje stanica u 2D i 3D okruženju (Tang *et al.*, 2013).

Tijekom migracije stanica, GTPaza Rho uključena je u polimerizaciju aktina i stvaranje sile kroz vezanje i aktivaciju formina mDia i kinaze ROCK (Narumiya, Tanji and Ishizaki, 2009). U klasičnom modelu migracije stanica u 2D, pretpostavlja se da su Rac i Cdc42 aktivni na prednjem kraju, gdje reguliraju stvaranje protruzija, dok je Rho aktivan samo straga, gdje regulira kontraktilne strukture koje sudjeluju u povlačenju stražnjeg kraja. Korištenjem biosenzora temeljenih na efektu FRET (*eng. Förster resonance energy transfer*), koji mjere aktivnost Rho GTPaza, pokazalo se da je ovaj model nepotpun, te da je Rho također aktivan i na prednjem kraju (Pertz *et al.*, 2006), gdje se aktivira prije Rac i Cdc42 (Machacek *et al.*, 2009). Predloženo je da u aktivaciji Rho na prednjem i stražnjem dijelu stanice sudjeluju dva različita GEF-a, jedan koji cilja Rho na prednjem kraju kako bi započeo polimerizaciju aktina (Machacek *et al.*, 2009), i drugi koji ga lokalizira na stražnji dio stanice kako bi se pospješilo odvajanje stražnjeg dijela od podloge (Raftopoulou and Hall, 2004). Navedena istraživanja ukazuju na složenost i međusobnu povezanost signalizacije posredovane Rho GTPazama tijekom migracije stanica.

Značajnu ulogu u reorganizaciji citoskeleta također imaju i proteini iz skupine IQGAP (*eng. IQ motif containing GTPase activating protein*). IQGAP proteini su potporni proteini, i kod ljudi su identificirana tri člana: IQGAP1, IQGAP2 i IQGAP3 koji mogu vezati širok spektar molekula (White, Erdemir and Sacks, 2012). Najbolje istraženi član, IQGAP1, sadrži uzastopno ponavljajući motiv IQ prema kojem je cijela skupina dobila ime. Različite uloge proteina iz skupine IQGAP određene su njihovom različitom lokalizacijom te specifičnim vezivnim partnerima. IQGAP1 se nakuplja na prednjem kraju stanice tijekom stanične migracije, i na spojevima između stanica, gdje se vjeruje da mijenja stabilnost tih spojeva izravnim vezanjem na kadherine. Pokazalo se da nekoliko različitih proteina (npr. protein 4.1

i ILK) i signalnih događaja (npr. aktivacija integrina i proizvodnja PIP2) reguliraju relokalizaciju i specifično regrutiranje IQGAP1 unutar stanice (Wickström *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2013; Jacquemet, Morgan, *et al.*, 2013). Također, pokazalo se da IQGAP1 izravno regulira aktivnost više malih GTPaza, nekih pozitivno a nekih negativno (Brown and Sacks, 2006; White, Erdemir and Sacks, 2012). Međutim, IQGAP1 ne djeluje izravno ni kao GEF ni kao GAP, već stabilizira aktivni ili neaktivni oblik GTPaze i/ili regrutira različite modulatore njihove aktivnosti (Brown and Sacks, 2006; Jacquemet, Morgan, *et al.*, 2013).

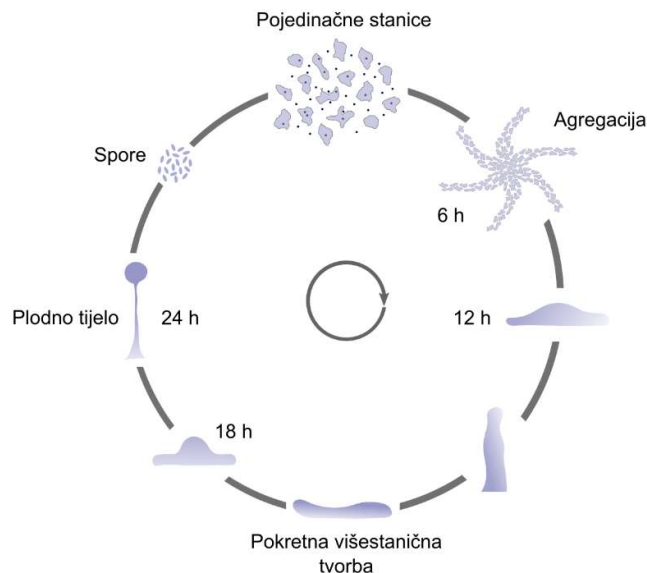
Protein IQGAP1 veže se izravno na Cdc42 i Rac1 (Heasman and Ridley, 2008). Vjeruje se da IQGAP1 produljuje aktivaciju tih proteina inhibicijom njihove intrinzične hidrolitičke aktivnosti (Hart *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1999; Brown and Sacks, 2006). Uz to, IQGAP1 vjerojatno sudjeluje u aktivaciji Rac1 regrutacijom RacGEF proteina Tiam1 (Usatyuk *et al.*, 2009). Iznenađujuće, čini se da IQGAP1 također igra ulogu i u negativnoj regulaciji aktivnosti Rac1. U stanicama fibroblasta i osteosarkoma, supresija ekspresije proteina IQGAP1 izaziva pojačanu, nereguliranu aktivnost Rac1, što dovodi do nekontroliranih protruzija membrane i poremećaja u usmjerenoj migraciji stanica (Jacquemet, Green, *et al.*, 2013; Jacquemet, Morgan, *et al.*, 2013). Nadalje, analizom rezultata masene spektrometrije proteinskih kompleksa koji sadrže IQGAP1, protein RacGAP1 prepoznat je kao interakcijski partner IQGAP1, što podupire nalaze o ulozi IQGAP1 u deaktivaciji Rac1 (Jacquemet, Morgan, *et al.*, 2013). RacGAP1 također djeluje kao GAP za Cdc42 (Bastos *et al.*, 2012), te je stoga moguće da regrutiranje RacGAP1 posredovano pomoću IQGAP1 modulira i aktivnost Cdc42. Suprotstavljene uloge IQGAP1 u promicanju aktivacije i deaktivacije Rho GTPaza mogu biti ovisne o kontekstu i/ili uvjetovane specifičnošću interakcija IQGAP1 s partnerima. U svakom slučaju, objavljeni podaci sugeriraju da je IQGAP1 važna kontrolna točka integracije različitih signalnih događaja koji reguliraju aktivnost Rho GTPaza.

### 1.3 Modelni organizam: *Dictyostelium discoideum*

*Dictyostelium discoideum* je eukariotski organizam iz skupine "društvenih" ameba (razred *Dictyostelia*), a poznat je po svojem jedinstvenom životnom ciklusu (Slika 1-4). Prirodno stanište *D. discoideum* je listopadno šumsko tlo i trulo lišće, gdje žive jednostanične amebe hraneći se bakterijama i kvascima. Nedostatak nutrijenata inducira agregaciju stanica u višestanične tvorbe koja uključuje kompleksne obrasce koordiniranog kretanja stanica i strogo

kontrolirani program stanične diferencijacije, te rezultira izgradnjom plodnih tijela koja se sastoje od stalka i sferičnog nosača spora - sporokarpa.

*D. discoideum* nudi jedinstvene prednosti kao modelni organizam. Ima kratak životni ciklus, jednostavno ga je uzgajati u laboratoriju na krutim podlogama s bakterijama, ili u tekućim hranjivim medijima gdje se hrani makropinocitozom. *D. discoideum* je haploidan organizam čiji je genom u potpunosti sekvenciran (Eichinger *et al.*, 2005), pa se njime može razmjerno lako manipulirati pomoću tehnika molekularne genetike. Tako je moguće konstruirati knock-out i knock-in mutante, kao i prekomjerno eksprimirati proteine od interesa, te ih fuzionirati s fluorescentnim proteinima radi funkcionalne karakterizacije i proučavanja lokalizacije *in vivo*. Obzirom da su stanice *D. discoideum* iznimno pokretljive, predstavljaju idealan poligon za proučavanje mehanizama koji reguliraju organizaciju aktinskog citoskeleta (Noegel and Schleicher, 2000).



Slika 1-4. **Životni ciklus *D. discoideum*.** Prilagođeno prema <http://www.dictybase.org/Multimedia/DdLifeCycles/index.html>

Unatoč evolucijskoj udaljenosti od sisavaca, stanice *D. discoideum* opremljene su složenim repertoarom signalnih komponenti povezanih s Rho GTPazama. Sekvenciranjem genoma utvrđeno je postojanje velikog broja proteina koji sudjeluju u Rho signalizaciji: 20 Rho GTPaza, više od 100 regulatora (GEF-ova, GAP-ova, i GDI proteina), te približno 80 efektornih proteina ili komponenti efektornih kompleksa. Sve Rho GTPaze u *D. discoideum* nazvane su Rac (Rac1A, Rac1B, Rac1C, RacA, RacB, RacC, RacD, RacE, RacF1, RacF2, RacG, RacH, RacI, RacJ, RacL, RacM, RacN, RacO, RacP i RacQ), iako se, strogo uzevši,



samo Rac1A, Rac1B, Rac1C, RacF1, RacF2, i RacB mogu svrstati u podobitelj Rac zajedno s ortolozima Rac iz drugih eukariota (Rivero and Somesh, 2002; Wang *et al.*, 2013). RacA spada u skupinu RhoBTB, dok su ostale GTPaze nazvane Rac iz povijesnih razloga i ne mogu se svrstati niti u jednu grupu obitelji Rho. Homolozi Cdc42 i Rho iz metazoa nisu pronađeni u ovom organizmu, iako su RacC i RacE njihovi funkcionalni analozi (Filić *et al.*, 2021). Svi proteini iz obitelji Rho posjeduju karakterističan Rho insert bogat nabijenim aminokiselinским ostacima, koji doprinosi specifičnosti funkcija Rho GTPaza u odnosu na male GTPaze iz drugih obitelji. Druga značajka karakteristična za Rho GTPaze je motiv CAAX, koji je važan za povezivanje Rho proteina s membranama. Motiv CAAX je prisutan u svim Rac proteinima iz *D. discoideum* osim u RacA, RacD i RacP.

Kao i u drugim organizmima, Rho GTPaze iz *D. discoideum* primarno utječu na remodeliranje aktinskog citoskeleta, što je potvrđeno u brojnim studijama koje su koristile eksperimentalne pristupe *in vitro* i *in vivo*. Povećane razine F-aktina pronađene su u stanicama koje prekomjerno eksprimiraju Rac1, RacB i RacC, a snižene razine u stanicama kojima nedostaje RacB ili prekomjerno eksprimiraju dominantno negativne, neaktivne oblike Rac1 ili RacC. Ove tri GTPaze potrebne su i za učinkovitu polimerizaciju aktina potaknutu stimulacijom pomoću kemoatraktanta cAMP (Chung *et al.*, 2000; Dumontier *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2006). Nasuprot tome, čini se da RacE, RacG i RacH nemaju velik utjecaj na polimerizaciju aktina. Istodobno s promjenama u razinama F-aktina, prekomjerna unutarstanična produkcija mnogih Rho GTPaza izaziva morfološke promjene u obliku protruzija ovisnih o aktinu. Izraženiji lamelipodiji i filopodiji, te protruzije nalik kruni, pojavljuju se u stanicama koje prekomjerno eksprimiraju Rac1 (Chung *et al.*, 2000; Dumontier *et al.*, 2000). Pojačana ekspresija konstitutivno aktivnog RacB izaziva stvaranje nepravilnih struktura različitih od onih uzrokovanih divljim tipom ili konstitutivno aktivnom formom proteina RacC (Seastone *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2006), dok ekspresija divljeg tipa, kao i konstitutivno aktivne forme proteina RacG, inducira formiranje povećanog broja filopodija (Somesh *et al.*, 2006).

## 1.4 *D. discoideum* Rac1 i ciljni proteini

### *Rac1*

U organizmu *D. discoideum* postoje tri izoforme Rac1 proteina, Rac1A, Rac1B i Rac1C, čije su domene za interakciju s ciljnim proteinima identične onoj iz humanog Rac1. Studije u

kojima je Rac1A fuzioniran sa zelenim fluorescentnim proteinom (GFP) pokazale su da je Rac1 u *D. discoideum* lokaliziran uglavnom u citoplazmi, i blago obogaćen u korteksu i perinuklearnoj regiji. Kortikalno nakupljanje manje je vidljivo u stanicama koje se dijele, a nije vidljivo u stanicama u agregacijskom stadiju životnog ciklusa (Dumontier *et al.*, 2000; Filić *et al.*, 2012). Rac1 je također prisutan na membranama endocitotskih čašica i endosoma, a identificiran je i kao komponenta fagosoma i makropinosoma (Gotthardt *et al.*, 2006; Journet *et al.*, 2012). Budući da Rho GTPaze djeluju kao molekularne sklopke, alternirajući između aktivne i neaktivne forme, za proučavanje funkcije Rac1 važnije je pratiti dinamiku aktivne forme negoli ponašanje cjelokupne populacije proteina. Stoga su za praćenje aktivnosti Rac1 u stanicama *D. discoideum* razvijene tri fluorescentno obilježene sonde koje se temelje na domenama GBD (*eng.* *GTPase binding domain*) iz efektornih proteina PakB (Veltman *et al.*, 2012), štakorske kinaze PAK1 (Filić *et al.*, 2012), te kinaze DPAKa (Marinović *et al.*, 2016). U ovom radu smo koristili stanice koje ekspimiraju sondu sastavljenu od domene GBD iz kinaze DPAKa fuzionirane sa žutim fluorescentnim proteinom (YFP), koja se veže specifično na aktivni oblik Rac1A, i omogućuje preciznije praćenje dinamike aktivnosti Rac1 u odnosu na ostale navedene sonde (Marinović *et al.*, 2016).

Prijašnja istraživanja sugeriraju da u stanicama *D. discoideum* postoje dvije različite populacije aktivnog Rac1. Fluorescentne sonde za aktivni Rac1 nakupljaju se pretežno na prednjem kraju stanice, dorzalnim naborima, fagosomima i makropinosomima vegetativnih stanica, gdje interagiraju većinom s efektornim proteinima iz grupe WASP. Globalni puls kemoatraktanta, bilo folne kiseline (u vegetativnim stanicama) ili cAMP-a (u stanicama sposobnim za agregaciju), izaziva prolazno nakupljanje aktivnog Rac1 u čitavom staničnom korteksu koje traje oko 12 s (Filić *et al.*, 2012; Veltman *et al.*, 2012; Plak *et al.*, 2013). S druge strane, praćenje efektornog proteina DGAP1, koji spada u ranije spomenutu skupinu IQGAP proteina i za kojeg je poznato da se nakuplja u stražnom dijelu stanice i također veže aktivni Rac1 (Faix *et al.*, 2001), sugerira da se jedan dio aktivnog Rac1 nalazi u područjima korteksa koja su komplementarna onima u kojima je sonda za aktivni Rac1 dominantno obogaćena (Filić *et al.*, 2012, 2014). Isto tako, DGAP1 pokazuje suprotnu dinamiku od glavnine aktivnog Rac1 nakon pulsne stimulacije folnom kiselinom - njegova koncentracija u staničnom korteksu se smanjuje. U agregacijski kompetentnim migrirajućim stanicama, DGAP1 se također dominantno nakuplja na stražnjem kraju stanice (Filić *et al.*, 2012).

Činjenica da su aminokiselinske sekvence triju Rac1 izoformi u *D. discoideum* 90% identične i da dijele identičnu domenu za interakciju s efektornim proteinima sugerira da bi ti proteini mogli imati redundantne uloge u stanici. Uvid u djelovanje izoformi Rac1 stečen je iz

nekoliko neovisnih studija u kojima su proučavani efekti njihove prekomjerne ekspresije (Chung *et al.*, 2000; Dumontier *et al.*, 2000; Palmieri *et al.*, 2000; Duleh, Collins and Pope, 2005). U kombinaciji s podacima o efektornim proteinima i regulatorima Rac1 u *D. discoideum* (Filić *et al.*, 2021; Forbes *et al.*, 2022), te su studije utvrdile jasne uloge Rac1 u staničnoj morfologiji, pokretljivosti, kemotaksiji, citokinezi i endocitozi; uloge koje kod sisavaca dijele proteini iz skupina Rac i Cdc42. Pokazalo se da prekomjerna ekspresija divljeg tipa bilo koje od triju izoformi Rac1 rezultira stanicama s povišenim razinama F-aktina u korteksu, te brojnijim dugačkim razgranatim filopodijima bogatim aktinom, a ima i umjereno pozitivan učinak na rast u tekućem mediju i na bakterijama, na kretanje i na endocitozu (Dumontier *et al.*, 2000). Nasuprot tome, ekspresija konstitutivno aktivnih formi Rac1 uzrokuje širok raspon negativnih učinaka: usporeni rast, smanjenu endocitozu i pokretljivost, manju učinkovitost u kemotaksiji, nakupljanje multinukleiranih stanica u suspenziji, te usporenu razvojnu fazu životnog ciklusa (Chung *et al.*, 2000; Dumontier *et al.*, 2000).

Djelovanje Rac1 GTPaza posredovano je brojnim efektorima koji uključuju proteine obitelji WASP, IQGAP, PAK kinaze i formine. Vezanje GTPaze za efektor dovodi do promjene njegove konformacije i omogućuje mu uspostavljanje daljnjih interakcija. Većina efektoru nosi jednu od sljedećih očuvanih domena koje vežu Rho proteine: (1) CRIB domena, koja je karakteristična za dvije velike obitelji proteina, WASP i PAK. U *D. discoideum* ova je domena prisutna u tri WASP i osam PAK proteina. (2) Rho GBD domena karakteristična za formine, i prisutna u *D. discoideum* u deset proteina ove familije i u dva RasGEF-a. (3) GRD domena (*eng. GAP-related domain* ili *RasGAP homology domain*) karakteristična za IQGAP proteine, koja zbog supstitucija aminokiselina u regijama bitnim za katalitičku aktivnost ne stupa u interakciju s Ras proteinima, niti potiče GTPaznu aktivnost, već stupa u interakciju s aktiviranim Rho GTPazama. Ova se domena može pronaći u sva četiri IQGAP proteina u *D. discoideum*. (4) Hrl domena (*eng. protein kinase C-related kinase homology region 1*), izvorno identificirana u nekoliko proteina koji vezuju RhoA (Ho *et al.*, 2004).

### *WASP obitelj*

Proteini obitelji WASP uključeni su u brojne biološke procese koji zahtijevaju remodeliranje aktinskog citoskeleta, poput stvaranja protruzija (lamelipodija, filopodija), transporta vezikula, stvaranja adhezija između stanice i podloge, te citokineze (Pollitt and Insall, 2009). WASP proteini reguliraju polimerizaciju aktina putem aktivacije Arp2/3 kompleksa. U *D. discoideum* ova se obitelj sastoji od proteina WASP, WASH, kompleksa Scar/WAVE, te još dva proteina

srodna WASP-u. Kompleks Scar/WAVE i protein WASP imaju posebno značajne uloge u regulaciji aktinskog citoskeleta tijekom kretanja stanice.

Heteropentamerni kompleks Scar/WAVE sastoji se od proteina Scar, PIR121, Nap1, Abi i HSPC300. Scar/WAVE se u stanicama *D. discoideum* tranzijentno nakuplja u vrhovima filopodija i pseudopodija (Veltman *et al.*, 2012), slično kao i u stanicama ljudskih neutrofila (Weiner *et al.*, 2007). Koncentracija F-aktina u stanicama deficitarnim za Scar smanjena je za 50%. Posljedično, takve stanice imaju smanjenu sposobnost makropinocitoze, fagocitoze i egzocitoze (Seastone *et al.*, 2001). Također, *scar*<sup>-</sup> stanice su značajno manje od stanica divljeg tipa, sporije se kreću i imaju manje pseudopodije (Blagg *et al.*, 2003; Ura *et al.*, 2012).

Protein WASP u *D. discoideum* ima važnu ulogu u kemotaksiji. Stanice sa smanjenom ekspresijom WASP-a imaju značajno manje F-aktina na prednjem kraju, te se ne mogu polarizirati u gradijentu kemoatraktanta (Myers *et al.*, 2005). WASP se aktivira vezanjem GTPaze RacC, ali pokazano je i da interagira s konstitutivno aktivnim oblicima GTPaza Rac1B, RacA, B i C, te humanih Rac1 i Cdc42 (Han *et al.*, 2006).

#### *IQGAP obitelj*

Proteini srodni proteinima iz obitelji IQGAP imaju četiri predstavnika u *D. discoideum*: DGAP1, GAPA, IqgC i IqgD, od kojih su najviše istraživani DGAP1 i GAPA. Svi IQGAP proteini iz *D. discoideum* sadrže domenu GRD, domenu RGCT, i nekoliko slabo konzerviranih IQ ponavljanja. Svima njima, osim proteinu IqgD, nedostaju N-terminalne domene koje vežu aktin, a koje su karakteristične za IQGAP proteine sisavaca (Vlahou and Rivero, 2006). Unatoč tome, DGAP1 i GAPA vežu se na aktinski citoskelet neizravno, preko heterodimera korteksilina I i II s kojima tvore kompleks, a koji posjeduju domene za vezanje na F-aktin (Faix *et al.*, 2001; Mondal *et al.*, 2010). Delecije gena za proteine DGAP1 i GAPA uzrokuju promjene u citokinezi i kemotaksiji, te pojačanu polimerizaciju aktina. Također, vezanje na Rac1 pokazalo se nužnim za ispravno funkcioniranje tih proteina.

#### *PAK kinaze*

Genom *D. discoideum* sadrži 9 gena koji kodiraju 8 kinaza iz obitelji PAK: PAKa-PAKh. PAKa (ili DPAKa), PAKb i PAKc uključene su u kemotaksiju i regulaciju stanične polarnosti (Chung and Firtel, 1999; Lee *et al.*, 2004). Za PAKa i PAKb pokazana je interakcija *in vitro* s aktivnim Rac1 proteinima, ali i drugim Rac GTPazama, te humanim Rac1 i Cdc42 (Lee *et al.*, 1996; Müller-Taubenberger *et al.*, 2002; de la Roche *et al.*, 2005). Opsežna istraživanja provedena u stanicama deficitarnim za PAKa i sojevima koji prekomjerno ekspimiraju

različite mutirane oblike PAKa, pokazuju da je ova kinaza uključena u regulaciju putova koji potiču sastavljanje filamenata aktina i miozina II, iako se potonji mehanizmi bolje razumiju. PAKa je citosolni protein koji se nakuplja u staničnom korteksu vegetativnih stanica, a u agregacijski kompetentnim stanicama lokaliziran je na stražnjoj strani stanica (Chung and Firtel, 1999; Müller-Taubenberger *et al.*, 2002). PAKa pomaže u održavanju stanične polarnosti sprječavanjem stvaranja nasumičnih pseudopodija i omogućavanjem pravilnog povlačenja stražnjeg dijela. U stanicama deficitarnim za PAKa, lokalizacija miozina II je poremećena i usnopljavanje miozina II kao odgovor na stimulaciju pomoću kemoatraktanta cAMP je zaustavljeno.

### *Formini*

Formini čine važnu obitelj regulatora dinamike aktina. Prisutni su u svim eukariotima, gdje su uključeni u širok raspon procesa temeljenih na aktinu. U organizmu *D. discoideum* prisutno je 10 formina: ForA-ForJ. Pokazano je da interagiraju s profilinom II i aktivnim Rac1 *in vitro* i *in vivo*. Lokalizirani su u vrhovima filopodija gdje sudjeluju u stabilizaciji i produljivanju aktinskih filamenata (Schirenbeck *et al.*, 2005).

## 1.5 Polarnost, oscilacije, modeli i mehanizmi povratne sprege

Stanična polarizacija je ključna za odvijanje mnogobrojnih procesa u eukariotskim stanicama i tkivima višestaničnih organizama poput diobe, kretanja, formiranja epitelnih tkiva, embriogeneze, umrežavanja neurona itd. Značajni eksperimentalni i teorijski naponi u razumijevanju osnovnih mehanizama stanične polarizacije utvrdili su postojanje evolucijski očuvanih proteina te univerzalnih biofizičkih principa koji reguliraju polarnost, ali su također otkrili i zapanjujuću raznolikost, redundantnost i promjenjivost mehanizama polarnosti u različitim sustavima (Drubin and Nelson, 1996; Martin-Belmonte and Mostov, 2008; McCaffrey and Macara, 2012). Prigogine i kolege predložili su da se Turingov mehanizam za generiranje prostornih obrazaca putem nestabilnosti prostorno homogenog stanja uzrokovane difuzijom (Turing, 1952), tzv. Turingove nestabilnosti, može smatrati odgovornim za spontane prijelaze koji narušavaju simetriju u stanicama (Prigogine and Nicolis, 1967; Prigogine *et al.*, 1969). Predvidjeli su da ova vrsta slamanja simetrije igra važnu ulogu u biologiji i pokazali da se može dogoditi samo u sustavima daleko od termodinamičke ravnoteže. Od tada se koncept narušavanja simetrije čvrsto etablirao u biologiji (Kirschner, Gerhart and Mitchison, 2000;

Atkins, Yoshida and Pellman, 2008; Li and Bowerman, 2010). Dok se izvorna Turingova ideja temeljila na međudjelovanju kemijskih reakcija i difuzije, pokazalo se da i hidrodinamičke (Gowrishankar *et al.*, 2012; Tjhung, Marenduzzo and Cates, 2012), mehaničke (Howard, Grill and Bois, 2011; Maiuri *et al.*, 2015), i električne (Homblé and Léonetti, 2007; Chang and Minc, 2014) sile također mogu dovesti do narušavanja simetrije.

Osim stacionarnih polarnih obrazaca, u stanicama se također često pojavljuju dinamički obrasci u obliku oscilacija. Poznati primjeri uključuju cirkadijalne ritmove koji omogućuju stanicama anticipirati promjene u okolišu tijekom ciklusa dan-noć (Dibner, Schibler and Albrecht, 2010), i oscilacije proteina koje pomažu definirati ravninu diobe u nekim tipovima stanica (Loose, Kruse and Schwille, 2011; Morin and Bellaïche, 2011). Unutarstanične oscilacije su intrinzično disipativne i potrebno ih je stalno održavati na životu. U stanicama se potrebna energija obično osigurava razlikom u kemijskim potencijalima ATP-a (ili GTP-a) i produkata njihove hidrolize, ADP-a (ili GDP-a) i anorganskog fosfata  $P_i$ ,  $\Delta\mu = \mu_{ATP} - \mu_{ADP} - \mu_{P_i}$ . Sve dok je  $\Delta\mu > 0$ , kemijska energija oslobođena tijekom hidrolize ATP-a može pokretati disipativne procese. Konkretno, ta energija može dovesti stanične sustave u stanje dugotrajnog spontanog osciliranja, prema kojem teže sva stanja u njegovom susjedstvu - oscilatorno stanje tada se naziva atraktor, odnosno granični ciklus.

Matematičko modeliranje procesa polarizacije i oscilacija u stanicama uglavnom se bazira na reakcijsko-difuzijskim jednadžbama. U aproksimaciji srednjeg polja govorimo o sustavu parcijalnih diferencijalnih jednadžbi koje opisuju prostorno-vremensku raspodjelu kontinuiranih funkcija gustoća (koncentracija) kemijskih komponenti (npr. proteina), i uključuju članove koji opisuju izmjenu tvari između različitih prostornih odjeljaka (npr. membrane i citoplazme), te reakcije stvaranja i raspadanja proteinskih kompleksa. Osim reakcijskih, jednadžbe također sadrže i difuzijske članove koji opisuju proces kretanja molekula u prostornim odjeljcima. Postoje dva osnovna pristupa u konstruiranju ovakvih matematičkih modela. U prvom pristupu, reakcije su opisane korištenjem kemijskog zakona o djelovanju masa (*eng. Law of mass action*), koji kaže da su stope reakcija direktno proporcionalne produktu koncentracija reaktanata. Ovakav se pristup uglavnom koristi za sveobuhvatan opis interakcija između svih proteina u modelu (Huang, Meir and Wingreen, 2003; Goryachev and Pokhilko, 2008; Halatek and Frey, 2012; Klünder *et al.*, 2013), te često rezultira velikim brojem jednadžbi, što pak može dovesti do tehničkih poteškoća u analiziranju karakteristika modela. Zbog toga autori nerijetko koriste heurističke, ali matematički dobro istražene modele kao što su "aktivator-inhibitor" i "aktivator-supstrat" (Meinhardt and Gierer,

2000; Hecht, Kessler and Levine, 2010; Mori, Jilkin and Edelstein-Keshet, 2011; Chiou *et al.*, 2018). Međutim, neovisno o odabranom pristupu, u model moraju biti uključeni nelinearni reakcijski članovi, bez kojih nije moguće reproducirati slamanje simetrije i pojavu stacionarnih i dinamičkih obrazaca. Nelinearni članovi mogu opisivati procese kooperativnosti, autokatalitičke aktivacije proteina, odnosno mehanizme pozitivne i negativne povratne sprege.

Rani teorijski modeli koji su nastojali objasniti slamanje unutarstanične simetrije Rho GTPaza bili su motivirani polariziranim nakupljanjem GTPaze Cdc42, za koje je pokazano da pokreće pupanje u kvascu *S. cerevisiae* (Dawes and Edelstein-Keshet, 2007; Goryachev and Pokhilko, 2008). Već je u ovim pionirskim radovima prepoznata ključna uloga autokatalitičke aktivacije u polarizaciji Cdc42. Petlja pozitivne povratne sprege opisana je sljedećim nizom reakcija: 1) predloženo je da stvaranje kompleksa između za Cdc42 specifičnog GEF-a, Cdc24, i potpornog proteina Bem1 pospješuje zadržavanje Cdc24 na membrani; 2) aktivni Cdc42, koji ostaje na membrani dok ga GAP ne deaktivira, veže i aktivira svoje različite efektore, uključujući Bem1; 3) vezanje Bem1 na aktivni Cdc42 regrutira kompleks Cdc24-Bem1 iz citoplazme i dodatno pospješuje zadržavanje Cdc24 kroz stvaranje trimolekularnog kompleksa; 4) nakon što ga Cdc42 i Bem1 stabiliziraju na membrani, Cdc24 aktivira dodatan broj Cdc42 molekula vezanih za membranu (Butty *et al.*, 2002; Irazoqui, Gladfelter and Lew, 2003; Wedlich-Soldner *et al.*, 2004). Ovaj mehanizam naknadno je istražen uporabom reakcijsko-difuzijskih modela (Johnson, Jin and Lew, 2011; Woods and Lew, 2019), optogenetičke manipulacije membranskom distribucijom Bem1 (Woods *et al.*, 2015) i lokalnog regrutiranja Cdc24 i Bem1 na membranu (Witte, Strickland and Glotzer, 2017). Slični mehanizmi povratne sprege kontroliraju polarizaciju Cdc42 u fisijskom kvascu *S. pombe*, a uključuju potporni protein Scd2 i GEF protein Scd1 (Endo, Shirouzu and Yokoyama, 2003; Lamas *et al.*, 2020). Nadalje, u neutrofilima je pronađeno da se PIP3 i Rac međusobno aktiviraju putem uzajamne pozitivne povratne sprege (Weiner *et al.*, 2002; Srinivasan *et al.*, 2003; Inoue and Meyer, 2008), a nedavno je identificiran GEF protein P-Rex1 kao primarni aktivator Rac-a kojega stimulira PIP3 (Graziano *et al.*, 2017). Osim regulacije aktinskog citoskeleta nizvodno od Rho GTPaza, neke ciljne molekule također mogu djelovati kao pretvarači povratne sprege u svrhu regulacije lokalne aktivacije same GTPaze, uglavnom djelujući unutar multiproteinskih kompleksa (Lawson and Ridley, 2018). Možda je najpoznatiji takav kompleks tripartitna signalna jedinica GIT- $\beta$ -PIX-PAK u koju su uključeni RhoGEF  $\beta$ -PIX i Rac1 efektor PAKa, a koja potiče aktivnost Rac1 u fokalnim adhezijama (Frank and Hansen, 2008). Još jedan GEF specifičan za Rac1, Tiam1, povezuje aktivirani Rac1 s njegovim efektorom WAVE2 u lamelipodiju (Connolly *et al.*, 2005). Nedavno otkriće da su stanice

kvasca kojima nedostaju Cdc42 efektori Gic1 i Gic2 defektne u polarizaciji samog Cdc42 ističe važnu ulogu efektoru GTPaza u mehanizmima povratne sprege (Daniels, Zyla and Lew, 2018).

Osim u polarizaciji, povratne sprege također su razmatrane u kontekstu tranzijentnih oscilacija Cdc42 u kvascima *S. cerevisiae* i *S. pombe* (Das *et al.*, 2012; Howell *et al.*, 2012). Budući da se smatralo da oscilatorno ponašanje u biološkim sustavima zahtijeva prisutnost negativne povratne sprege s odgodom (Novák and Tyson, 2008), oscilacije Cdc42 između dva pola u stanicama fisijskog kvasca modelirane su uz pretpostavku da Cdc42 pokreće vlastito uklanjanje putem nekog generičkog mehanizma negativne povratne sprege (Das *et al.*, 2012). Predloženo je da Cdc42 posreduje u aktivaciji GAP proteina, te alternativno, da Cdc42 efektorni protein Pak1 inhibira fosforilaciju GEF proteina Cdc24 (Howell *et al.*, 2012; Kuo *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015). Slična uključenost proteina GEF i GAP specifičnih za Cdc42 u regulaciju oscilacija putem petlji negativne povratne sprege naknadno je analizirana i kod *S. pombe* (Das *et al.*, 2015; Khalili *et al.*, 2020). Konačno, spomenimo i sustav Min proteina u bakteriji *E. coli*, kao jedan od najbolje proučenih primjera unutarstaničnih oscilacija (Howard, Rutenberg i de Vet, 2001; Kruse, 2002; Huang, Meir i Wingreen, 2003). I ovdje su se povratne sprege pokazale neophodnima za nastanak stojnih i putujućih valova (Huang, Meir and Wingreen, 2003).

Uz spomenute mehanizme, važnu ulogu u formiranju polarnih i oscilatornih obrazaca imaju i nasumične fluktuacije, koje potiču pojavu prostorno heterogenih stanja, odnosno prijelaz iz stabilne ravnoteže u dinamičko, nestabilno stanje (Altschuler *et al.*, 2008; Jilkine *et al.*, 2011). U nedavnoj studiji stohastičkog modela polarizacije Cdc42 u stanicama kvasaca otkriveno je da stohastičnost može povećati brzinu polarizacije (Pablo, Ramirez and Elston, 2018). Također, u jednoj inačici stohastičkog modela dinamike Cdc42 u *S. pombe* primijećena je pojava oscilacija u parametarskom režimu u kojem se odgovarajući deterministički sustav nalazi u ravnotežnom stanju (Xu, Kang and Jilkine, 2019). Sličan fenomen u kojem nasumične fluktuacije omogućuju pojavu održivih oscilacija zabilježen je i u drugim biološkim modelima uključujući model grabežljivac-plijen (McKane and Newman, 2005), ciklički Lotka–Volterra model (Reichenbach, Mobilia and Frey, 2006), te stohastički Wilson–Cowanov model (Bressloff, 2010).



## 2 METODE

### 2.1 Mikroskopija i obrada slika

U eksperimentima su korištene stanice *D. discoideum* roditeljskog soja AX2, u kojima su eksprimirane fluorescentne sonde za aktivni Rac1 i DGAP1 (Marinović et al., 2016). Kao sonda za aktivni Rac1 korištena je domena GBD iz kinaze DPAKa koja je fuzionirana sa žutim fluorescentnim proteinom (DPAKa(GBD)-DYFP). Protein DGAP1 direktno je vezan za crveni fluorescentni protein (DGAP1-mRFP). Fluorescencijska mikroskopija obavljena je na Leica TCS SP8 X mikroskopu opremljenom ekscitacijskim laserom sa superkontinuiranom emisijom. Valne duljine pobude te rasponi detekcije bili su: (1) 511 nm i 520-565 nm za DYFP, i (2) 575 nm i 585-630 nm za mRFP. Za snimanje u trajanju od približno 10 minuta odabrane su stanice s umjerenom ekspresijom fluorescentnih sonda. Vremenski razmak između dvije uzastopne slike postavljen je na  $dt = 1.3$  s. Segmentacija dobivenih snimki obavljena je pomoću dodatka računalnom programu ImageJ, Quimp. Quimp koristi algoritam 'aktivnih kontura', koji mu omogućuje prepoznavanje i izdvajanje stanice iz pozadine slike (Dormann et al., 2002). Izlazne informacije među ostalim uključuju pomak centroide stanice, prijedni put, brzinu kretanja, elongaciju i cirkularnost stanice, njenu površinu, te najvažnije za ovaj rad, intenzitete fluorescencije na membrani i u citoplazmi. Zbog promjenjivosti oblika i veličine stanice tijekom akvizicije podataka, broj i relativni položaj točaka u kojima Quimp uzorkuje fluorescenciju po membrani stanice nije konstantan u vremenu. Da bismo pospjegli naknadnu obradu i analizu podataka, tu nepravilnu mrežu prostornih i vremenskih koordinata zamijenili smo pravilnom, konstruiranjem skupa pravilno razmaknutih točaka na intervalu čija je duljina jednaka prosječnoj izmjerenoj duljini membrane,  $L$ ;  $x = (0, dx, 2dx, \dots, L - dx)$ ,  $t = (0, dt, 2dt, \dots, t_e)$ , gdje  $dx = L/100$ , i  $t_e \sim 10$  min. Vrijednosti intenziteta,  $I(x, t)$ , u novom skupu koordinata odredili smo interpolacijom pomoću kubične *spline* funkcije (Matlab: *csaps*). Osim za interpolaciju, kubičnu *spline* funkciju koristili smo i za uklanjanje šuma, odnosno izgladivanje podataka.

Za prikaze eksperimentalnih podataka u obliku kimografa prostornu varijablu  $x$  zamijenili smo kutnim položajem  $\varphi$ . Zbog lakšeg uočavanja ponavljajućih obrazaca u raspodjeli intenziteta sonde za aktivni Rac1 i DGAP1, dodatno smo izračunali autokorelacijsku funkciju  $A$ , koju definiramo kao

$$A(\Delta\varphi, \Delta t) = \frac{\langle I_{\Delta}(\varphi + \Delta\varphi, t + \Delta t) \cdot I_{\Delta}(\varphi, t) \rangle_{\varphi, t}}{\langle I_{\Delta}^2(\varphi, t) \rangle_{\varphi, t}},$$

gdje  $\langle \rangle_{\varphi, t}$  označava prosjek po položaju i vremenu, i gdje vrijedi  $I_{\Delta}(\varphi, t) = I(\varphi, t) - \langle I(\varphi, t) \rangle_{\varphi}$ .

## 2.2 Analiza glavnih komponenti

Analizu glavnih komponenti primjenjujemo pri određivanju prosječne evolucije signala sonde za aktivni Rac1 i DGAP1 u stanicama čije je ponašanje periodičkog karaktera.

Neka  $\mathcal{I}_{\text{Rac1}}$  i  $\mathcal{I}_{\text{DGAP1}}$  redom predstavljaju matrice intenziteta fluorescencije Rac1 i DGAP1 sonde. To su  $n \times 100$  matrice, gdje je  $n$  jednak broju vremenskih točaka, a 100 je broj prostornih točaka uzorkovanih uzduž membrane stanice (vidi 2.1). Za početak, kreiramo  $2n \times m$  matricu  $\mathcal{X}$  vertikalnim spajanjem matrica  $\mathcal{I}_{\text{Rac1}}$  i  $\mathcal{I}_{\text{DGAP1}}$ . U kontekstu analize glavnih komponenti, svaki vektor stupac matrice  $\mathcal{X}$  tretirat ćemo kao jednu podatkovnu točku u  $2n$ -dimenzionalnom prostoru. U sljedećem koraku standardiziramo podatke, odnosno računamo udaljenost svake točke od srednjaka u jedinicama standardne devijacije. Retci standardizirane matrice podataka  $\mathcal{Z}$  dani su sa

$$\mathcal{Z}_{i,*} = \frac{\mathcal{X}_{i,*} - \mu(\mathcal{X}_{i,*})}{\sigma(\mathcal{X}_{i,*})}$$

gdje simbol  $i, *$  označava  $i$ -ti redak matrice;  $\mu$  predstavlja srednjak;  $\sigma$  označava standardnu devijaciju.

Nastavljamo s utvrđivanjem glavnih komponenti. U tu svrhu služimo se Matlab funkcijom `pca`. Ulazna varijabla funkcije `pca` jest matrica  $\mathcal{Z}$ , dok se kao izlaz generira  $2n \times 2n$  matrica  $\mathcal{C}$ , čiji svaki stupac sadrži koeficijente za jednu glavnu komponentu, a koji su dobiveni računanjem svojstvenih vektora matrice kovarijance podataka  $\mathcal{Z}$ . Stupci matrice  $\mathcal{C}$  poredani su po veličini varijance pojedine komponente, od najveće prema najmanjoj. Slika 2-1A prikazuje reprezentativni primjer doprinosa ukupnoj varijanci za prvih 10 glavnih komponenti. Jasno se može iščitati da je većina informacije o dinamici Rac1 i DGAP1 sadržana uzduž osi prvih dviju glavnih komponenti. Drugim riječima, dimenzionalnost naših podataka možemo reducirati projiciranjem svake podatkovne točke na ravninu razapetu prvim dvjema glavnim komponentama. Računamo

$$c_{1,j} = \mathcal{Z}_{*,j} \cdot \mathcal{C}_{*,1} \text{ i } c_{2,j} = \mathcal{Z}_{*,j} \cdot \mathcal{C}_{*,2}$$

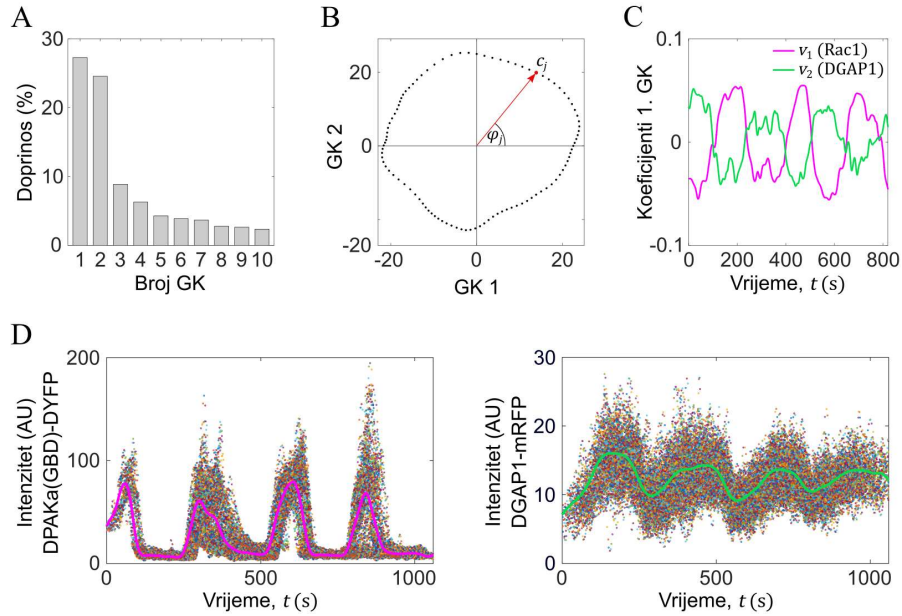
gdje  $c_{1,j}$  i  $c_{2,j}$  redom predstavljaju projekcije  $j$ -te podatkovne točke na osi prve i druge glavne komponente. Vizualiziranje projiciranih podataka ne samo da potvrđuje periodičku narav dinamike proteina Rac1 i DGAP1, već otkriva i faznu razliku između svake podatkovne točke

(Slika 2-1B). Ovu informaciju koristimo za pomicanje svih točaka ne bismo li stvorili novi, 'poravnati' skup podataka. Vremenski pomak  $j$ -te točke dan je sa

$$\Delta t_j = -T\varphi_j/2\pi$$

gdje  $\varphi_j$  predstavlja fazni kut, dok je s  $T$  označen period.

Period možemo odrediti na više načina, a jedan od njih jest da iskoristimo koeficijente prve glavne komponente. Vektor  $v_1 = (c_{1,1}, \dots, c_{n,1})$  tretiramo kao vremenski niz intenziteta fluorescencije sonde za Rac1, a vektor  $v_2 = (c_{n+1,1}, \dots, c_{2n,1})$  kao vremenski niz intenziteta fluorescencije sonde za DGAP1. Grafički prikaz ovih vektora kao funkcija vremena otkriva njihov oscilatorni karakter, pa ih stoga koristimo za određivanje perioda (Slika 2-1C). Sada je lako poravnati sve vremenske nizove intenziteta i iz njih izračunati prosječni vremenski niz koji predstavlja dinamiku proteina u svim prostornim točkama (Slika 2-1D).



Slika 2-1. **Primjer primjene analize glavnih komponenti na obrascu putujućeg vala.** (A) Doprinosi prvih 10 glavnih komponenti ukupnoj varijanci skupa podataka izraženi u postocima. Prve dvije komponente doprinose više od 50% varijance, pa ih stoga koristimo za opisivanje dinamike Rac1-GTP i DGAP1 sondi. (B) Projekcija matrice  $Z$  na prve dvije glavne komponente, (GK1, GK2) pokazuje fazne odnose svih podatkovnih točaka. Pomakom svake točke  $c_j$  za kut  $-\varphi_j$  stvaramo poravnati skup. (C) Koeficijenti prve glavne komponente predstavljeni kao vremenski nizovi Rac1-GTP i DGAP1 sondi. (D) Poravnati vremenski nizovi intenziteta fluorescencije DPAKa(GBD)-DYFP (lijevo) i DGAP1-mRFP (desno). Svaka boja označava vremenski niz koji pripada jednoj točki na membrani, dok debele linije predstavljaju prosječnu vremensku evoluciju signala.

## 2.3 Simetrija i entropija obrazaca - simetropija

Simetropija je matematički pojam koji u sebi udružuje svojstva simetrije i entropije, a u ovom je radu korišten kako bi koncizno kvantificirao ta svojstva kod izmjerenih i modeliranih obrazaca raspodjele proučavanih proteina. Iznos simetropije za svaki se pojedini obrazac mjeri korištenjem dvodimenzionalnih diskretnih Walshovih funkcija. Ako razmatramo simetriju obrasca, on postaje manje anizotropan s povećanjem simetropije, dok s gledišta entropije taj isti obrazac povećanjem simetropije postaje više neuređen. Ovdje ćemo ukratko iznijeti proceduru računanja simetropije opisanu u (Yodogawa, 1982).

### *Walshove funkcije*

Walshove funkcije čine potpun skup ortogonalnih funkcija (Slika 2-2A), te se stoga mogu koristiti za reprezentaciju bilo koje diskretne funkcije, kao što se trigonometrijske funkcije mogu koristiti za prikaz bilo koje kontinuirane funkcije u Fourierovoj analizi. Mi ih ovdje koristimo za reprezentaciju funkcije intenziteta fluorescencije  $I(x, t)$ .

Walshova funkcija  $wal_k$ , reda  $k$ , definira se na intervalu  $[0,1)$  na sljedeći način:

$$wal_k(x) = \prod_{q=0}^{r-1} \text{sgn}[(\cos 2^q \pi x)^{k_q}],$$

$$k = 0, 1, 2, \dots,$$

gdje je  $k_q = 0$  ili  $1$ ;  $q = 0, 1, \dots, r-1$  su znamenke binarnog oblika cijelog broja  $k$  takve da vrijedi

$$k = \sum_{q=0}^{r-1} k_q 2^q;$$

broj  $r$  je najmanji pozitivni cijeli broj takav da  $2^r > k$ ;  $\text{sgn}(x)$  je  $-1$  ako  $x < 0$ , te  $+1$  ako  $x > 0$ . Kada  $(\cos 2^q \pi x)^{k_q} = 0$ , definiramo

$$\text{sgn}[(\cos 2^q \pi x)^{k_q}] = \text{sgn}\{[\cos 2^q \pi(x + o)]^{k_q}\},$$

gdje je  $o$  bilo koji realni broj unutar intervala  $(0, 2^{-r})$ . Također, po definiciji  $0^0 = 1$ .

Neka je interval  $[0,1)$  podijeljen na  $M = 2^s$  jednakih podintervala, gdje je  $s$  pozitivan cijeli broj. Vrijednost diskretne Walshove funkcije  $w_m(i)$  sada se može definirati kao vrijednost Walshove funkcije  $m$ -tog reda na  $i$ -tom podintervalu, gdje  $m, i = 0, 1, \dots, M-1$ .

### Dvodimenzionalna diskretna Walshova transformacija

Dvodimenzionalna diskretna Walshova funkcija  $W_{m,n}$ , reda  $(m, n)$ , definirana je na kvadratnoj domeni, podijeljenoj na  $M \times M$  jednakih kvadratnih poddomena. Vrijednost funkcije u poddomeni  $(i, j)$  određena je s

$$W_{m,n}(i, j) = w_m(i)w_n(j), \quad m, n, i, j = 0, 1, 2, \dots, M-1.$$

Stoga, pri korištenju Walshove transformacije, za domenu ne odabiremo cijeli obrazac  $I(x, t)$ , već jedan kvadratni odsječak obrasca, kojeg zapisujemo kao  $M \times M$  matricu  $\mathcal{F}$ . Dvodimenzionalna diskretna Walshova transformacija  $M \times M$  obrasca sada se može definirati kao

$$a_{m,n} = \frac{1}{M^2} \sum_{i,j} \mathcal{F}_{i,j} W_{m,n}(i, j). \quad (2.3.1)$$

Inverzna transformacija dana je sa

$$\mathcal{F}_{i,j} = \sum_{m,n} a_{m,n} W_{m,n}(i, j).$$

Funkcija  $a_{m,n}$  također se naziva dvodimenzionalni Walshov spektar, dok se  $a_{m,n}^2$  naziva dvodimenzionalni Walshov spektar snage. Iz jednadžbe (2.3.1), za  $m, n = 0$  dobivamo

$$a_{0,0} = \frac{1}{M^2} \sum_{i,j} \mathcal{F}_{i,j}.$$

Član  $a_{0,0}$  interpretira se kao prosječna vrijednost intenziteta promatranog obrasca, odnosno matrice  $\mathcal{F}$ . Spektri snage  $a_{m,n}^2$  mogu se normalizirati na sljedeći način:

$$C = \sum_{m,n} a_{m,n}^2 - a_{0,0}^2, \quad (2.3.2)$$

$p_{m,n} = (a_{m,n}^2)/C$ , ( $C \neq 0$  pretpostavljeno).

Dakle,  $p_{m,n} \geq 0$  i  $\sum_{m,n} p_{m,n} = 1$ , gdje je suma napravljena po svim uređenim parovima  $(m, n)$ , osim  $(0, 0)$ . Razlog zbog kojega se  $a_{0,0}^2$  oduzima od zbroja spektara snage u jednadžbi (2.3.2) jest taj što  $a_{0,0}^2$  predstavlja spektar snage obrasca  $\mathcal{F}$  za funkciju  $W_{0,0}(i, j)$ , koja ne sadrži nikakvu informaciju o obliku.

### Mjerenje simetrije

Svojstva dvodimenzionalnih Walshovih funkcija u pogledu simetrije su (Slika 2-2B):

$$W_{m,n} = \begin{cases} \text{vertikalno simetrična} & \text{ako } m = \text{paran}, n = \text{neparan} \\ \text{horizontalno simetrična} & \text{ako } m = \text{neparan}, n = \text{paran} \\ \text{centralno simetrična} & \text{ako } m = \text{neparan}, n = \text{neparan} \\ \text{dvostruko simetrična} & \text{ako } m = \text{paran}, n = \text{paran} \end{cases}$$

Koristeći ova svojstva, dvodimenzionalni spektar snage može se podijeliti na četiri komponente:

vertikalno simetrična komponenta

$$P_1 = \sum_{\substack{m=\text{par} \\ n=\text{nep}}} p_{m,n},$$

horizontalno simetrična komponenta

$$P_2 = \sum_{\substack{m=\text{nepar} \\ n=\text{par}}} p_{m,n},$$

centralno simetrična komponenta

$$P_3 = \sum_{\substack{m=\text{nep} \\ n=\text{nep}}} p_{m,n},$$

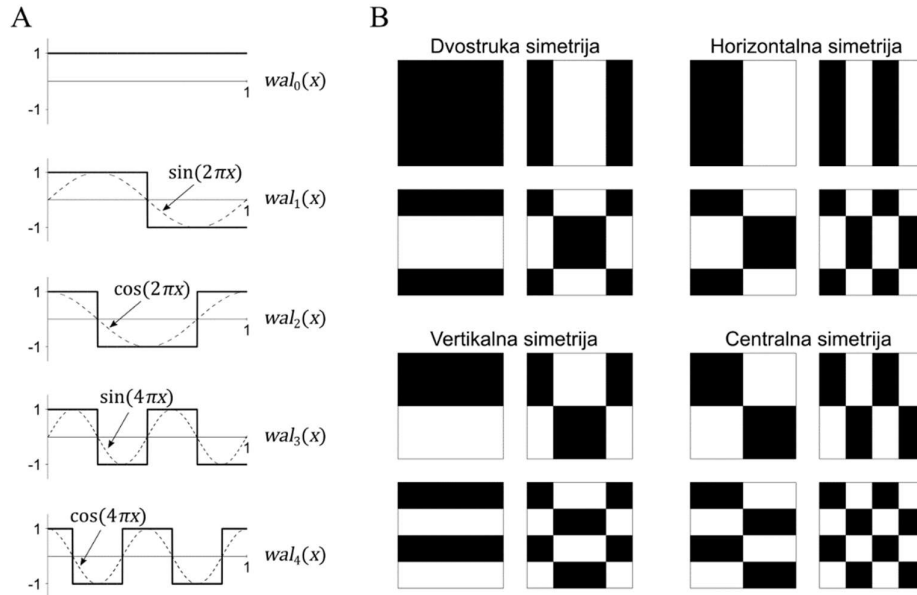
dvostruko simetrična komponenta

$$P_4 = \sum_{\substack{m=\text{par} \\ n=\text{par}}} p_{m,n},$$

gdje se sumira po svim uređenim parovima  $(m, n)$ , osim  $(0,0)$ .

Sada možemo formalno definirati simetropiju kao

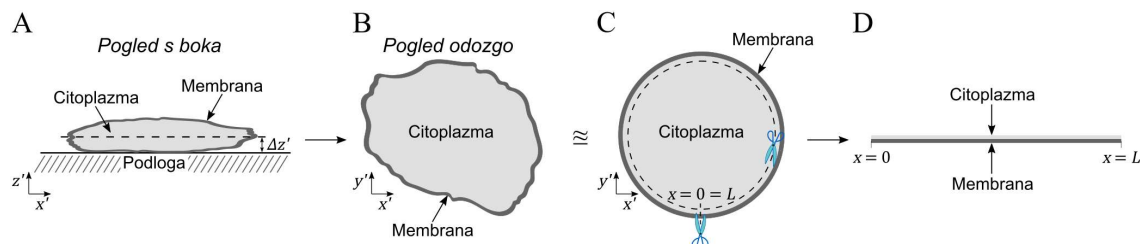
$$S = - \sum_{k=1}^4 P_k \log_2 P_k.$$



Slika 2-2. **Walshove funkcije.** (A) Superpozicija prvih 5 Walshovih funkcija i odgovarajućih Fourierovih sinusoidalnih funkcija. (B) Dvodimenzionalne Walshove funkcije (za  $M = 4$ ) poslagane prema tipovima simetrije. Crna boja predstavlja +1, a bijela -1. Preuzeto i prilagođeno iz (Yodogawa, 1982).

## 2.4 Reakcijsko-difuzijske jednačbe

Matematičke modele u ovom radu razmatramo na jednodimenzionalnoj prostornoj domeni  $\Omega = [0, L)$ , koja je topološki ekvivalentna prstenu. Zbog jednostavnosti, odabrali smo da ovakva prostorna domena predstavlja i citoplazmu i membranu stanice (Slika 2-3).



Slika 2-3. **Odabir prostorne domene korištene u matematičkom modeliranju.** (A) Ilustrativni prikaz stanice koja se nalazi na podlozi, gledano s bočne strane. Citoplazma je naznačena svijetlo sivom, a membrana tamno sivom bojom. Budući da stanice obično leže priljubljene uz podlogu, molekule imaju više slobode za kretanje u  $x'y'$ -ravnini, odnosno dinamika molekula je donekle neovisna o  $z'$ -položaju. Zbog toga odabiremo jednu  $x'y'$  plohu unutar stanice koja će predstavljati cijelu stanicu (označena iscrtanom linijom na visini  $\Delta z'$  od podloge). (B) Pogled na odabranu plohu odozgo. (C) Stanica aproksimirana krugom, iz kojeg je izrezan središnji dio; preostaju membrana i tanak sloj citoplazme uz membranu. Poprečnim rezom razdvajamo točke  $x = 0$  i  $x = L$ . (D) Konačno, odmotavanjem dobivamo linearnu prostornu domenu.

U aproksimaciji srednjeg polja, distribucije molekula pojedinih kemijskih komponenti opisujemo linearnim koncentracijama  $u = (u_1, \dots, u_k)$ , gdje simbol  $u_i = u_i(x, t)$  predstavlja koncentraciju kemijske komponente  $U_i$ , na položaju  $x \in \Omega$  u trenutku  $t$ . Sve koncentracije moraju zadovoljiti reakcijsko-difuzijske jednačbe koje zapisujemo u sljedećoj formi:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = \mathcal{D} \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \mathcal{N}_\Lambda(u) \quad \forall (x, t) \in \Omega \times (0, \infty). \quad (2.4.1)$$

Prvi član u izrazu (2.4.1) opisuje difuziju kemijskih komponenti, gdje je simbolom  $\mathcal{D}$  označena  $k \times k$  dijagonalna matrica s vrijednostima difuzijskih konstanti smještenim na dijagonali. Simbol  $\mathcal{N}_\Lambda: \mathbb{R}^k \rightarrow \mathbb{R}^k$  predstavlja glatku funkciju koja opisuje lokalne reakcije među kemijskim supstancama, a simbol  $\Lambda := \{\lambda_1, \dots, \lambda_p\}$  predstavlja skup reakcijskih parametara, odnosno skup konstanti brzina (stopa) reakcija, obzirom da se u ovom radu fokusiramo na kemijske reakcije koje podliježu zakonu o djelovanju masa. Osim jednačbe (2.4.1), koncentracije i njihove prve prostorne derivacije moraju zadovoljavati periodičke rubne uvjete, budući da  $x = 0$  i  $x = L$  predstavljaju istu prostornu točku.

### Stehiometrijska matrica

Označimo s  $R := \{R_1, \dots, R_n\}$  skup svih reakcija u kojima kemijske komponente sudjeluju.

Svaka reakcija  $R_j$  ima pridruženu stopu reakcije  $r_j$ , koju definiramo kao broj reakcija tog tipa po jedinici vremena i po jedinici duljine. Stehiometrijski koeficijenti  $s_{ij}$  određuju koliko će jedinica komponente  $U_i$  biti stvoreno (ili razgrađeno) tijekom reakcije  $R_j$ . Stoga je promjena koncentracije  $u_i$  u vremenu, uzrokovana reakcijom  $R_j$ , dana izrazom  $(\partial u_i / \partial t)_{R_j} = s_{ij} r_j$ . Uzmemo li u obzir sve reakcije u kojima komponenta  $U_i$  sudjeluje, dobit ćemo

$$\left(\frac{\partial u_i}{\partial t}\right)_R = \sum_{j=1}^n s_{ij} r_j.$$

Konačno, nakon što uključimo i ostale komponente, dobivamo matričnu jednadžbu

$$\left(\frac{\partial u}{\partial t}\right)_R = \mathcal{S}r = \begin{pmatrix} s_{11} & s_{12} & \cdots & s_{1n} \\ s_{21} & s_{22} & \cdots & s_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ s_{k1} & s_{k2} & \cdots & s_{kn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \vdots \\ r_n \end{pmatrix} = \mathcal{N}_\Lambda(u). \quad (2.4.2)$$

Matrica  $\mathcal{S}$  naziva se stehiometrijska matrica. Dakle, izraz (2.4.1) možemo zapisati i u sljedećem obliku

$$\frac{\partial}{\partial t} u = \frac{\partial^2}{\partial x^2} \mathcal{D}u + \mathcal{S}r,$$

odnosno

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} u_1 \\ u_2 \\ \vdots \\ u_k \end{pmatrix} = \frac{\partial^2}{\partial x^2} \begin{pmatrix} d_1 u_1 \\ d_2 u_2 \\ \vdots \\ d_k u_k \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} s_{11} & s_{12} & \cdots & s_{1n} \\ s_{21} & s_{22} & \cdots & s_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ s_{k1} & s_{k2} & \cdots & s_{kn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \vdots \\ r_n \end{pmatrix}, \quad (2.4.3)$$

gdje je  $s_{ij}$  označena difuzijska konstanta komponente  $U_i$ .

## 2.5 Linearna analiza stabilnosti

Linearna analiza stabilnosti (*eng. Linear stability analysis*) je matematička tehnika kojom se ispituje stabilnost ravnotežnih stanja, odnosno ponašanje sustava u neposrednoj blizini ravnotežnih stanja. Ravnotežno stanje  $u^0 = (u_1^0, \dots, u_k^0)$  homogeno je u prostoru, i određeno izrazom  $\mathcal{N}_\Lambda(u^0) = 0$ . Ovdje simboli  $u_1^0, \dots, u_k^0$  predstavljaju ravnotežne koncentracije odgovarajućih komponenti.

Originalni sustav jednadžbi (2.4.1) zamjenjuje se njegovom linearnom aproksimacijom, što se postiže kreiranjem linearnog operatora  $\mathcal{L}_\Lambda$  koji aproksimira nelinearnu funkciju  $\mathcal{N}_\Lambda$  u blizini ravnotežnog stanja. Pišemo

$$\mathcal{N}_\Lambda(u^0 + \epsilon) = \mathcal{N}_\Lambda(u^0) + \mathcal{L}_\Lambda \cdot \epsilon + \sigma(\epsilon). \quad (2.5.1)$$



Član  $\mathcal{L}_\Lambda \cdot \epsilon$  naziva se diferencijal funkcije  $\mathcal{N}_\Lambda$  u točki  $u^0$ . Sa  $v \mapsto \sigma(\epsilon)$  označavamo mapiranje iz  $\mathbb{R}^k$  u  $\mathbb{R}^k$ , takvo da za norme  $\|\cdot\|_1$  i  $\|\cdot\|_2$  vrijedi

$$\lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\|\sigma(\epsilon)\|_2}{\|\epsilon\|_1} = 0, \quad (2.5.2)$$

gdje su norme definirane sa  $\|x\|_n = (\sum_{j=1}^k |x_j|^n)^{1/n}$ , za  $n \geq 1$ , i  $x \in \mathbb{R}^k$ . Obzirom da je  $\mathcal{L}_\Lambda$  linearni operator na konačnodimenzionalnom vektorskom prostoru, moguće je konstruirati njegovu matricnu reprezentaciju

$$\mathcal{L}_\Lambda = \begin{pmatrix} \alpha_{11} & \alpha_{12} & \dots & \alpha_{1k} \\ \alpha_{21} & \alpha_{22} & \dots & \alpha_{2k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \alpha_{k1} & \alpha_{k2} & \dots & \alpha_{kk} \end{pmatrix}.$$

Da bismo odredili članove ove matrice, odabiremo  $\epsilon = (0, \dots, \epsilon_j, \dots, 0)$ . Sada je

$$\mathcal{L}_\Lambda \cdot \epsilon = \epsilon_j \begin{pmatrix} \alpha_{1j} \\ \alpha_{2j} \\ \vdots \\ \alpha_{kj} \end{pmatrix} = \epsilon_j \alpha_{*j}$$

odnosno, jednačba (2.5.1) postaje

$$\mathcal{N}_\Lambda(u^0 + \epsilon) = \mathcal{N}_\Lambda(u^0) + \mathcal{L}_\Lambda \cdot \epsilon + \sigma(\epsilon) = \mathcal{N}_\Lambda(u^0) + \epsilon_j \alpha_{*j} + \sigma(\epsilon).$$

Koristeći (2.5.2) dobivamo

$$\alpha_{*j} = \lim_{\epsilon_j \rightarrow 0} \frac{\mathcal{N}_\Lambda(u^0 + \epsilon) - \mathcal{N}_\Lambda(u^0)}{\epsilon_j} = \left. \frac{\partial \mathcal{N}_\Lambda}{\partial u_j} \right|_a.$$

Dakle,  $k \times k$  matrica  $\mathcal{L}_\Lambda$ , koja se često naziva i Jacobijeva matrica, određena je izrazom

$$\mathcal{L}_\Lambda = \begin{pmatrix} \left. \frac{\partial \mathcal{N}_\Lambda}{\partial u_1} \right|_{u^0} & \dots & \left. \frac{\partial \mathcal{N}_\Lambda}{\partial u_k} \right|_{u^0} \end{pmatrix}. \quad (2.5.3)$$

Nelinearni problem (2.4.1) sada pretvaramo u linearni, te pišemo

$$\frac{\partial \epsilon}{\partial t} = \mathcal{D} \frac{\partial^2 \epsilon}{\partial x^2} + \mathcal{L}_\Lambda \cdot \epsilon \quad (2.5.4)$$

Definirajmo proširenu Jacobijevu matricu s  $\mathcal{L}_\Pi = \mathcal{L}_\Lambda - q^2 \mathcal{D}$ , gdje simbol  $\Pi := \{\lambda_1, \dots, \lambda_p, d_1, \dots, d_k\}$  predstavlja prošireni skup parametara, koji obuhvaća i difuzijske konstante. Za perodične rubove i dijagonalizibilne matrice  $\mathcal{L}_\Pi$ , opće rješenje jednačbe (2.5.4) dano je kao linearna kombinacija partikularnih rješenja oblika

$$\epsilon_p(x, t) = z e^{\omega_\Pi t} e^{iqx}. \quad (2.5.5)$$

Konstanta  $\omega_\Pi$  naziva se stopa rasta, a konstanta  $q$  naziva se valni broj;  $z$  predstavlja  $k \times 1$  vektor stupac. Rješenje jednačbe (2.5.4) pruža nam uvid u evoluciju malih perturbacija ravnotežnog stanja  $u^0$ . U slučaju da sve perturbacije trnu s vremenom,  $\text{Re } \omega_\Pi < 0$ , kažemo da

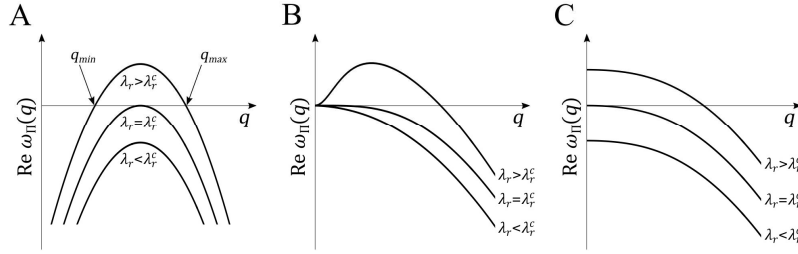
je stanje  $u^0$  asimptotski stabilno. S druge strane, ako postoji perturbacija koja s vremenom raste u amplitudi, stanje se naziva nestabilnim.

Supstituiranjem izraza (2.5.5) u linearnu jednadžbu (2.5.4) dobit ćemo jednostavnu relaciju koja povezuje konstante  $\omega_\Pi$  i  $q$ ,

$$\mathcal{L}_\Pi z = \omega_\Pi z. \quad (2.5.6)$$

Jednadžba (2.5.6) predstavlja problem svojstvenih vrijednosti (*eng. eigenvalue problem*), pa je stoga vektor  $z$  svojstveni vektor, a stopa rasta  $\omega_\Pi$  svojstvena vrijednost operatora  $\mathcal{L}_\Pi$ . Općenito, operator  $\mathcal{L}_\Pi$  može imati  $j \leq k$  različitih svojstvenih vrijednosti,  $(\omega_1, \dots, \omega_j)_\Pi$ , no mi ćemo se fokusirati na onu svojstvenu vrijednost koja ima najveći realni dio. Definiramo  $\omega_\Pi := \omega_{max}$  za koju vrijedi  $\text{Re } \omega_{max} = \max(\text{Re}(\omega_1, \dots, \omega_{max}, \dots, \omega_j)_\Pi)$ . Sada ćemo preciznije definirati uvjete pod kojima dolazi do stvaranja obrazaca. Neka je  $\lambda_r \in \Pi$  kontrolni parametar kojeg variramo. Kažemo da je ravnotežno stanje stabilno u odnosu na male perturbacije ako je realni dio stope rasta manji od nule za sve vrijednosti valnog broja,  $\text{Re } \omega_\Pi(q; \lambda_r) < 0, \forall q$ . Promjenom vrijednosti kontrolnog parametra stacionarno stanje postaje linearno nestabilno kada funkcija  $\text{Re } \omega_\Pi$  prvi put postane pozitivna za neki  $q = q_c$ . Vrijednost kontrolnog parametra kod koje dolazi do promjene stabilnosti,  $\lambda_r^c$ , naziva se kritična vrijednost, a promjena u karakteru ponašanja sustava naziva se bifurkacija. Valni broj  $q_c$  naziva se kritični valni broj, i predviđa prostornu skalu  $2\pi/q_c$  rastuće perturbacije. Možemo također pretpostaviti da  $q_c$  određuje prostornu skalu nelinearnih stanja tik iznad početka nestabilnosti. Imaginarni dio stope rasta u  $q_c$  određuje kritičnu frekvenciju  $\omega_c = \text{Im } \omega_\Pi(q_c; \lambda_r^c)$ , koja definira karakterističnu oscilatornu vremensku skalu rastuće perturbacije. Ako je  $\omega_c \neq 0$ , bifurkacija se naziva oscilatorna (Hopfova), a u slučaju da  $\omega_c = 0$ , bifurkacija je stacionarna (Turingova). Osim podjele na oscilatorne i stacionarne nestabilnosti, možemo koristiti i klasifikaciju baziranu na karakteristikama krivulja rasta  $\text{Re } \omega_\Pi$  u blizini  $\lambda_r^c$ . Ovakva podjela prepoznaje tri tipa nestabilnosti (Cross and Greenside, 2009):

- *Nestabilnost tipa I* (Slika 2-4A): Nestabilnost se prvo pojavljuje za valni broj veći od nule. Za  $\lambda_r > \lambda_r^c$ , ravnotežno stanje je nestabilno za perturbacije u pojasu valnih brojeva  $q_{min}(\lambda_r) < q < q_{max}(\lambda_r)$ .
- *Nestabilnost tipa II* (Slika 2-4B): Stopa rasta u  $q = 0$  uvijek je jednaka nuli. Često se javlja kad neka od zavisnih varijabli,  $u$ , podliježe zakonu sačuvanja, tako da je prostorni integral te varijable konstantan u vremenu.
- *Nestabilnost tipa III* (Slika 2-4C): Stopa rasta maksimalna je za  $q = 0$ , kako ispod tako i iznad praga  $\lambda_r^c$ .



Slika 2-4. Klasifikacija nestabilnosti prema karakteristikama krivulja rasta. Krivulje rasta  $\text{Re } \omega_{\Pi}$  prikazane su za tri vrijednosti kontrolnog parametra  $\lambda_r$ . (A) Nestabilnost tipa I. Pozitivne vrijednosti  $\text{Re } \omega_{\Pi}$  prvo se pojavljuju za  $q > 0$ . (B) Nestabilnost tipa II. Za svaki  $\lambda_r$  vrijedi  $\text{Re } \omega_{\Pi}(0) = 0$ . (C) Nestabilnost tipa III. Za svaki  $\lambda_r$  vrijedi  $\max(\text{Re } \omega_{\Pi}) = \text{Re } \omega_{\Pi}(0)$ .

Radi potpunosti, na kraju ćemo zapisati opće rješenje jednadžbe (2.5.4) definirane na intervalu  $\Omega = (0, L)$ . Valni broj  $q$  poprima diskretne vrijednosti parametrizirane s  $n$ ,  $q_n = 2n\pi/L$ , gdje je  $n = 0, 1, 2, \dots$  Kao što smo već napomenuli (izraz (2.5.5)), opće rješenje dano je linearnom kombinacijom Fourierovih modova ( $e^{iq_n x} \rightarrow \cos q_n x$  i  $\sin q_n x$ );

$$\epsilon(x, t) = \sum_{m=1, n=0}^{k, \infty} e^{\omega_{mn} t} z_{mn} (\eta_{mn} \cos q_n x + \mu_{mn} \sin q_n x), \quad (2.5.7)$$

gdje su  $z_{mn}$  i  $\omega_{mn}$   $m$ -ti svojstveni vektor i  $m$ -ta svojstvena vrijednost operatora  $\mathcal{L}_{\Lambda} - q_n^2 \mathcal{D}$ . Koeficijenti  $\eta_{mn}$  i  $\mu_{mn}$  određeni su kao rješenja algebarskih sustava  $\mathcal{B}_n \eta_{*n} = g_n$ ,  $\mathcal{B}_n \mu_{*n} = h_n$ , gdje je matrica  $\mathcal{B}_n$  sačinjena od vektor stupaca  $\{z_{mn}\}$ , a  $g_n$  i  $h_n$  određeni početnim uvjetom

$$\epsilon(x, 0) = \sum_n g_n \cos q_n x + h_n \sin q_n x.$$

Budući da pretpostavljamo da je za svaki  $n$  matrica  $\mathcal{L}_{\Lambda} - q_n^2 \mathcal{D}$  dijagonalizibilna, odnosno njeni svojstveni vektori čine potpun skup,  $\{z_{1n}, \dots, z_{kn}\}$ , gore navedeni algebarski sustavi imaju jedinstveno rješenje.

Pretpostavka da se matrica može dijagonalizirati nije neko osobito ograničenje s obzirom da je svojstvo nedijagonalizibilnosti vrlo krhko, zbog toga što i najmanja promjena bilo kojeg od članova matrice defektnu matricu pretvara u dijagonalizibilnu. U slučaju da ipak moramo o tome voditi računa, suma  $\sum_{m=1}^k e^{\omega_{mn} t} z_{mn}$  mora se zamijeniti s  $\sum_{m=1}^s \sum_{j=0}^{k_m-1} \frac{t^j e^{\omega_{mn} t}}{j!} z_{jn}(\omega_{mn})$ . Svaki  $z_{k_m-1, n}(\omega_{mn})$  predstavlja svojstveni vektor pridružen  $\omega_{mn}$ , dok  $\{z_{k_m-2, n}(\omega_{mn}), \dots, z_{1n}(\omega_{mn}), z_{0n}(\omega_{mn})\}$  predstavlja pridruženi lanac generaliziranih svojstvenih vektora. Ovdje smo pretpostavili da matrici  $\mathcal{L}_{\Lambda} - q_n^2 \mathcal{D}$  pripada skup svojstvenih vrijednosti  $\{\omega_{1n}, \omega_{2n}, \dots, \omega_{sn}\}$ , s  $\text{index}(\omega_{mn}) = k_{mn}$ , gdje je  $\text{index}(\omega_{mn})$

definiran kao najmanji pozitivni cijeli broj  $k_{mn}$  takav da vrijedi  $\text{rang}((\mathcal{L}_\Lambda - q_n^2 \mathcal{D} - \omega_{mn} I)) = \text{rang}((\mathcal{L}_\Lambda - q_n^2 \mathcal{D} - \omega_{mn} I))^{k_{mn}+1}$ . Za više detalja vidjeti npr. (Meyer, 2010).

## 2.6 Numeričke simulacije

U svrhu provedbe računalnih simulacija reakcijsko-difuzijskih sustava oblika (2.4.1), prostorna domena je diskretizirana na 100 jednako razmaknutih točaka  $(x_1, \dots, x_{100})$ . Položaj pojedine točke određen je s  $x_i = (i - 1) \cdot h$ , gdje  $i = 1, \dots, 100$ , i  $h = L/100$ . Prostorne derivacije zamijenjene su algebarskim aproksimacijama:

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}(x_i, t) &\cong \frac{u_{i+1}(t) - 2u_i(t) + u_{i-1}(t)}{h^2} & \text{za } i = 2, 3, \dots, 99 \\ \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}(x_1, t) &\cong \frac{u_2(t) - 2u_1(t) + u_{100}(t)}{h^2} \\ \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}(x_{100}, t) &\cong \frac{u_1(t) - 2u_{100}(t) + u_{99}(t)}{h^2}, \end{aligned}$$

U jednadžbe za točke  $x_1$  i  $x_{100}$  ugrađeni su periodički rubni uvjeti. Uvedene aproksimacije svaku parcijalnu diferencijalnu jednadžbu pretvaraju u 100 vezanih običnih diferencijalnih jednadžbi. Za rješavanje takvih sustava koristili smo Matlab funkciju `ode15s` (Thomas, 1995; Schiesser and Griffiths, 2009; *Solve stiff differential equations and DAEs - variable order method - MATLAB ode15s*).

## 2.7 Stohastičko modeliranje

Da bismo proučili utjecaj nasumičnih fluktuacija na formiranje obrazaca Rac1 proteina, konstruirali smo stohastički model temeljen na Gillespievom algoritmu, a koji opisujemo u nastavku teksta (Gillespie, 1977; Erban, Chapman and Maini, 2007; Erban and Chapman, 2009).

### *Teorijska osnova Gillespiejevog algoritma i stohastičke simulacije*

Započnimo najprije s jednostavnim primjerom; modeliranjem jedne kemijske reakcije (raspadanje kemijske tvari):

$$A \xrightarrow{\bar{\lambda}} \emptyset. \quad (2.7.1)$$

Ovdje  $A$  predstavlja vrstu kemijske tvari koja se raspada, a simbol  $\emptyset$  predstavlja kemijsku tvar koja nas u ovom konkretnom primjeru ne zanima (tvar na koju se  $A$  raspada). Konstanta  $\bar{\lambda}$  definirana je tako da  $\bar{\lambda}dt$  daje vjerojatnost raspada jedne nasumično odabrane molekule vrste  $A$  tijekom vremenskog intervala  $[t, t + dt)$ , gdje  $dt$  označava jako mali vremenski korak. Dakle, vjerojatnost da se tijekom vremenskog intervala  $[t, t + dt)$  dogodi točno jedna reakcija (2.7.1), jednaka je  $A(t)\bar{\lambda}dt$ , gdje  $A(t)$  predstavlja broj molekula vrste  $A$  u trenutku  $t$ . Napomenimo da  $dt$  mora biti takav da vrijedi  $A(t)\bar{\lambda}dt \ll 1$ .

Osnovni cilj Gillespiejevog algoritma jest odrediti trenutak  $t + \tau$ , u kojem će se odviti sljedeća reakcija (2.7.1). Označimo s  $f(A(t), s)ds$  vjerojatnost da će se, uz činjenicu da je u trenutku  $t$  broj molekula jednak  $A(t)$ , sljedeća reakcija odviti tijekom vremenskog intervala  $[t + s, t + s + ds)$ . Neka je  $g(A(t), s)ds$  vjerojatnost da se ne dogodi niti jedna reakcija u intervalu  $[t, t + s)$ . Tada se vjerojatnost  $f(A(t), s)ds$  može izračunati kao umnožak  $g(A(t), s)ds$  i vjerojatnosti za odvijanje jedne reakcije unutar intervala  $[t + s, t + s + ds)$ , koja je prema definiciji dana sa  $A(t + s)\bar{\lambda}ds$ . Dakle, imamo

$$f(A(t), s)ds = g(A(t), s)A(t + s)\bar{\lambda}ds.$$

Budući da se niti jedna reakcija ne dogodi tijekom  $[t, t + s)$ , vrijedi  $A(t + s) = A(t)$ . Slijedi

$$f(A(t), s)ds = g(A(t), s)A(t)\bar{\lambda}ds. \quad (2.7.2)$$

Izračunajmo vjerojatnost  $g(A(t), s)$ . Vjerojatnost da se niti jedna reakcija ne dogodi unutar  $[t, t + s + ds)$ , može se izračunati kao umnožak vjerojatnosti da se ne dogodi niti jedna reakcija u intervalu  $[t, t + s)$  i vjerojatnosti da se ne dogodi niti jedna reakcija u intervalu  $[t + s, t + s + ds)$ . Dakle

$$g(A(t), s + ds) = g(A(t), s)[1 - A(t + s)\bar{\lambda}ds].$$

Obzirom da nema reakcija unutar  $[t, t + s)$ , imamo  $A(t + s) = A(t)$ . Slijedi

$$\frac{g(A(t), s + ds) - g(A(t), s)}{ds} = -A(t)\bar{\lambda}g(A(t), s).$$

U limesu, kada  $ds \rightarrow 0$ , dobivamo običnu diferencijalnu jednadžbu (po varijabli  $s$ )

$$\frac{dg(A(t), s)}{ds} = -A(t)\bar{\lambda}g(A(t), s).$$

Rješavanjem ove jednadžbe, primjenjujući početni uvjet  $g(A(t), 0) = 1$ , dobivamo

$$g(A(t), s) = \exp[-A(t)\bar{\lambda}s].$$

Sada jednadžbu (2.7.2) možemo zapisati kao

$$f(A(t), s)ds = A(t)\bar{\lambda} \exp[-A(t)\bar{\lambda}s] ds. \quad (2.7.3)$$

Kada je gustoća vjerojatnosti određena eksponencijalnom funkcijom, očekivana vrijednost varijable  $s$  dana je sa

$$\langle s \rangle = \frac{1}{A(t)\bar{\lambda}}$$

Dakle, konstantu  $\bar{\lambda}$  možemo interpretirati kao prosječan broj reakcija po jedinici vremena po molekuli, odnosno kao stopu reakcije za jednu molekulu.

Kao što smo već rekli, naš je cilj pronaći  $\tau$  takav da je  $t + \tau$  trenutak u kojem će se odviti sljedeća reakcija. Broj  $\tau \in (0, \infty)$  nasumični je broj koji moramo generirati u skladu sa distribucijom vjerojatnosti (2.7.3). Da bismo to učinili, koristit ćemo pomoćnu funkciju  $F$  definiranu izrazom

$$F(\tau) = \exp[-A(t)\bar{\lambda}\tau]. \quad (2.7.4)$$

Funkcija  $F$  je monotonno opadajuća za  $A(t) > 0$ . Ako je  $\tau$  nasumični broj iz intervala  $(0, \infty)$ , tada je  $F(\tau)$  nasumični broj iz intervala  $(0, 1)$ . Ako se  $\tau$  odabire u skladu sa distribucijom vjerojatnosti (2.7.3), tada je  $F(\tau)$  nasumični broj uniformno distribuiran na intervalu  $(0, 1)$ , što možemo pokazati na sljedeći način. Neka su  $a, b, a < b$ , proizvoljno odabrani na intervalu  $(0, 1)$ . Vjerojatnost da je  $F(\tau) \in (a, b)$  jednaka je vjerojatnosti da je  $\tau \in (F^{-1}(b), F^{-1}(a))$ , gdje je  $s = F^{-1}$  označen inverz funkcije  $F$ . Koristeći (2.7.3) i (2.7.4) dobivamo

$$\begin{aligned} \int_{F^{-1}(b)}^{F^{-1}(a)} f(A(t), s)ds &= \int_{F^{-1}(b)}^{F^{-1}(a)} A(t)\bar{\lambda} \exp[-A(t)\bar{\lambda}s] ds \\ &= - \int_{F^{-1}(b)}^{F^{-1}(a)} \frac{dF}{ds} ds = -F[F^{-1}(a)] + F[F^{-1}(b)] = b - a \end{aligned}$$

Dakle, provjerili smo da je  $F(\tau)$  nasumični broj uniformno raspodijeljen unutar intervala  $(0, 1)$ . Takav se broj može generirati koristeći generator nasumičnih brojeva (npr. funkciju `rand` u Matlab-u). Označimo ga simbolom  $\rho$ . Koristeći (2.7.4) dobivamo

$$\rho = \exp[-A(t)\bar{\lambda}\tau]$$

odnosno

$$\tau = \frac{1}{A(t)\bar{\lambda}} \ln \left[ \frac{1}{\rho} \right] \quad (2.7.5)$$

Konačno, Gillespiejev algoritam za reakciju (2.7.1) možemo provesti na sljedeći način. Započnimo s  $t = 0$  i  $A(0) = A_0$ , te primjenjujemo sljedeća tri koraka u trenutku  $t$ :

1. Generiramo nasumični broj  $\rho$  uniformno raspodijeljen na intervalu  $(0, 1)$ .
2. Koristeći (2.7.5) izračunamo  $t + \tau$ , odnosno vrijeme kada se dogodila sljedeća reakcija.

3. Izračunamo broj molekula u trenutku  $t + \tau$  sa  $A(t + \tau) = A(t) - 1$ .

Ovi se koraci ponavljaju dok ne dosegemo vrijeme kada više nema molekula  $A$  u sistemu.

Prethodni primjer na jednostavan način prikazuje osnovne principe korištenja Gillespiejevog stohastičkog algoritma za simuliranje kemijskih reakcija. Poopćimo sada ovaj algoritam za primjenu na proizvoljnom broju reakcija.

#### *Stohastička simulacija proizvoljnog broja reakcija*

Razmatramo sustav od  $n$  kemijskih reakcija,  $\{R_1, R_2, \dots, R_n\}$ . Definiramo funkciju sklonosti  $\alpha_j(t)$  (eng. *propensity function*) za reakciju tipa  $R_j$ , tako da je  $\alpha_j(t)dt$  vjerojatnost odvijanja reakcije  $R_j$  u intervalu  $[t, t + dt)$ . Generalizirani algoritam zapisujemo u četiri koraka:

1. Generiramo dva nasumična broja,  $\rho_1$  i  $\rho_2$ , uniformno raspodjeljena na  $(0,1)$ .
2. Izračunamo funkciju sklonosti  $\alpha_j(t)$  za svaku reakciju, te izračunamo

$$\alpha_0 = \sum_j^n \alpha_j(t)$$

3. Izračunamo trenutak u kojem će se dogoditi sljedeća reakcija,  $t + \tau$ , gdje je  $\tau$  dan s

$$\tau = \frac{1}{\alpha_0} \ln \left[ \frac{1}{\rho_1} \right] \quad (2.7.6)$$

4. Izračunamo koja će se reakcija odviti u trenutku  $t + \tau$ . Tražimo  $i$  takav da

$$\rho_2 > \frac{1}{\alpha_0} \sum_{j=1}^{i-1} \alpha_j \text{ i } \rho_2 \leq \frac{1}{\alpha_0} \sum_{j=1}^i \alpha_j.$$

Nakon što smo ustanovili da će se u trenutku  $t + \tau$  odviti reakcija  $R_i$ , moramo ažurirati broj reaktanata i produkata te reakcije. Nastavljamo s ponavljanjem ovih četiriju koraka.

Dakle, u svakom vremenskom koraku najprije postavljamo pitanje: kada će se odviti sljedeća reakcija? Odgovor je dan izrazom (2.7.6), do kojeg se može doći koristeći iste argumente koje smo koristili za dobivanje formule (2.7.5). Nakon tog pitamo: koja će se od svih mogućih reakcija dogoditi u tom trenutku? Odluka o tome donosi se u 4. koraku uz pomoć drugog nasumičnog, uniformno raspodijeljenog broja  $\rho_2$ .

#### *Stohastička simulacija difuzije*

Prethodni algoritam predstavlja egzaktni pristup stohastičkom simuliranju sustava kemijskih reakcija, te je također pogodan za stohastičku simulaciju difuzije. Naime, ako podijelimo prostornu domenu  $[0, L)$  na  $K$  jednakih intervala, duljine  $h = L/K$ , te označimo broj molekula

vrste  $A$  u  $j$ -tom intervalu  $[(j-1)h, jh]$  s  $A_j$ ,  $j = 1, \dots, K$ , možemo primjeniti gore opisani algoritam na sljedeći lanac „kemijskih reakcija“:



gdje  $A_1 \xrightleftharpoons{\bar{d}} A_2$  znači  $A_1 \xrightarrow{\bar{d}} A_2$  (skok udesno) i  $A_2 \xrightarrow{\bar{d}} A_1$  (skok ulijevo).

U slučaju periodičkih rubnih uvjeta (koje mi koristimo), lanac se zatvara, odnosno postoji i difuzija molekula između prvog i zadnjeg intervala prostorne domene. Krećemo s početnim uvjetom  $A_j(t) = A_{0,j}$ ,  $j = 1, 2, \dots, K$ , te nastavljemo s pet koraka u trenutku  $t$ :

1. Generiramo dva nasumična broja,  $\rho_1$  i  $\rho_2$ , uniformno raspodjeljena na  $(0,1)$ .
2. Izračunamo funkcije sklonosti svih reakcija sa  $\alpha_j = A_j(t)\bar{d}$ , za  $j = 1, 2, \dots, K$ , te izračunamo

$$\alpha_0 = 2 \sum_{j=1}^K \alpha_j(t).$$

3. Izračunamo vrijeme sljedeće kemijske reakcije,  $t + \tau$ , gdje je  $\tau$  određen s (2.7.6).
4. Ako  $\rho_2 \leq \sum_{j=1}^K \alpha_j / \alpha_0$ , tražimo  $i \in \{1, 2, \dots, K\}$  takav da

$$\rho_2 > \frac{1}{\alpha_0} \sum_{j=1}^{i-1} \alpha_j \text{ i } \rho_2 \leq \frac{1}{\alpha_0} \sum_{j=1}^i \alpha_j.$$

Ako je  $i \neq K$  izračunamo broj molekula u trenutku  $t + \tau$  sa

$$\begin{aligned} A_i(t + \tau) &= A_i(t) - 1 \\ A_{i+1}(t + \tau) &= A_{i+1}(t) + 1 \\ A_j(t + \tau) &= A_j(t), \text{ za } j \neq i, j \neq i + 1. \end{aligned}$$

Ako je  $i = K$  izračunamo broj molekula u trenutku  $t + \tau$  sa

$$\begin{aligned} A_K(t + \tau) &= A_K(t) - 1 \\ A_1(t + \tau) &= A_1(t) + 1 \\ A_j(t + \tau) &= A_j(t), \text{ za } j \neq K, j \neq 1. \end{aligned}$$

5. Ako  $\rho_2 > \sum_{j=1}^K \alpha_j / \alpha_0$ , tražimo  $i \in \{1, 2, \dots, K\}$  takav da

$$\rho_2 > \frac{1}{\alpha_0} \left( \sum_{j=1}^K \alpha_j + \sum_{j=1}^{i-1} \alpha_j \right) \text{ i } \rho_2 \leq \frac{1}{\alpha_0} \left( \sum_{j=1}^K \alpha_j + \sum_{j=1}^i \alpha_j \right).$$

Ako je  $i \neq 1$  izračunamo broj molekula u trenutku  $t + \tau$  sa

$$\begin{aligned} A_i(t + \tau) &= A_i(t) - 1 \\ A_{i-1}(t + \tau) &= A_{i-1}(t) + 1 \end{aligned}$$



$$A_j(t + \tau) = A_j(t), \text{ za } j \neq i, j \neq i - 1.$$

Ako je  $i = 1$  izračunamo broj molekula u trenutku  $t + \tau$  sa

$$A_1(t + \tau) = A_1(t) - 1$$

$$A_K(t + \tau) = A_K(t) + 1$$

$$A_j(t + \tau) = A_j(t), \text{ za } j \neq K, j \neq 1.$$

Kombiniranjem algoritma za difuziju, te algoritma za kemijske reakcije (za svaki prostorni interval) lako možemo konstruirati konačni algoritam za stohastičko simuliranje reakcijsko-difuzijskih sustava.

#### *Parametri u stohastičkom modelu*

Iako se stohastički model značajno razlikuje od modela srednjeg polja, postoji jednostavna veza između skupa konstanti  $\{\bar{\lambda}_1, \dots, \bar{\lambda}_p\}$  korištenih u prvom, i skupa konstanti  $\{\lambda_1, \dots, \lambda_p\}$  korištenih u drugom modelu.

Kao što smo već spomenuli, funkciju sklonosti  $\alpha_j$  pridruženu reakciji tipa  $R_j$  možemo interpretirati kao prosječan broj reakcija tog tipa po jedinici vremena, odnosno kao stopu reakcije tipa  $R_j$ . Dok u slučaju stohastičkog modela govorimo o prosječnom broju reakcija, u slučaju modela srednjeg polja broj reakcija po jedinici vremena je uvijek isti, i za vrlo male prostorne intervale  $h$  iznosi  $r_j h$ , gdje  $r_j$  predstavlja stopu reakcije na jediničnom intervalu. Dakle, za vrlo mali  $h$  možemo pisati

$$\alpha_j = r_j h.$$

Osim toga, vrijedi

$$A = u h,$$

gdje  $u$  predstavlja koncentraciju u modelu srednjeg polja.

Sada je lako povezati konstante kemijskih reakcija u ta dva modela. Ako je unutar stohastičkog modela stopa reakcije na intervalu  $h$  primjerice jednaka  $\bar{\lambda} A$ , vrijedi

$$\bar{\lambda} A = \bar{\lambda} u h = r_j h = \lambda u h,$$

pa slijedi  $\bar{\lambda} = \lambda$ . Dakle, sve konstante  $\bar{\lambda}$  koje se nalaze u linearnim članovima izjednačavamo s vrijednostima odgovarajućih konstanti determinističkog modela. U slučaju bilinearnih članova dobivamo sljedeće

$$\bar{\lambda} AB = \bar{\lambda} u_A u_B h^2 = r_j h = \lambda u_A u_B h,$$

odnosno  $\bar{\lambda} = \lambda/h$ .

Na sličan način je moguće povezati konstantu reakcije  $\bar{d}$  iz (2.7.7) sa difuzijskom konstantom  $d$ . Koristeći aproksimaciju derivacije drugog reda iz 2.6 i prethodno navedenu vezu između stopa reakcija u stohastičkom modelu i stopa reakcija u modelu srednjeg polja, lako se može pokazati da vrijedi  $\bar{d} = d/h^2$ . S ovakvim izborom konstanti rezultati simulacija oba modela međusobno će se približavati sa smanjenjem intervala  $h$  i povećanjem broja molekula (koncentracija). U našim simulacijama postavili smo duljinu prostornog intervala na  $h = 1$ , pa stoga sve vrijednosti konstanti iz modela srednjeg polja nepromijenjene prenosimo u stohastički model.

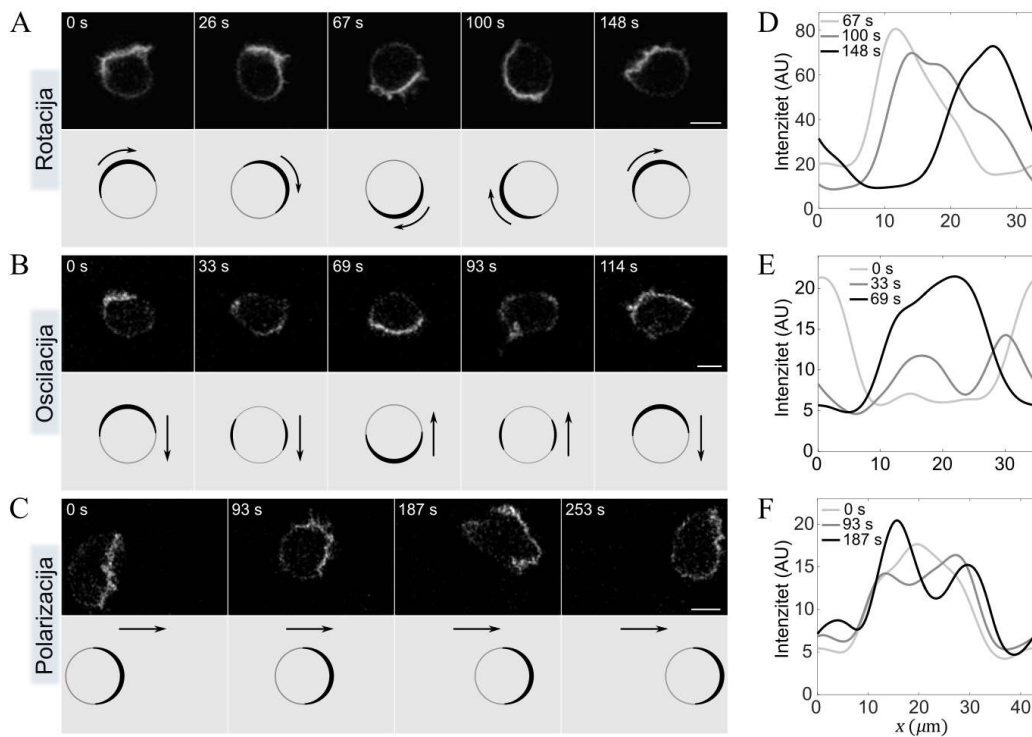
### 3 REZULTATI

Rezultati istraživanja koje predstavljamo u ovom radu podijeljeni su u četiri cjeline. U prvoj cjelini prikazujemo reprezentativne primjere tipično opaženih obrazaca u raspodjeli aktivnog proteina Rac1 na membrani stanice, koji uključuju polarna stanja, te putujuće i stojne valove. Također, prikazujemo snimke stanica koje istovremeno eksprimiraju fluorescentne sonde za aktivni Rac1 i za njegov efektni protein DGAP1. U dijelu rada posvećenom matematičkim modelima predstavljamo rezultate sistematične analize uvjeta pod kojima dolazi do stvaranja uređenih struktura u reakcijsko-difuzijskim sustavima. Najprije razvijamo apstraktne modele, od jednostavnijih prema složenijim, s ciljem pronalaska najjednostavnijeg modela koji je sposoban reproducirati polarne i oscilatorne obrasce. Takav model zatim koristimo za opis dinamike proteina Rac1, GAP i DGAP1. U nastavku rada provodimo usporedbu karakteristika obrazaca opaženih u eksperimentima s onima generiranim u simulacijama. Također, koristeći analizu glavnih komponenti prostorno-vremenskih raspodjela fluorescencije, konstruiramo tipične vremenske profile putujućih valova Rac1 i DGAP1, te analiziramo njihove međusobne odnose, i uspoređujemo ih s rezultatima simulacija. Posljednji dio rada posvećen je kvantifikaciji pravilnosti snimljenih obrazaca, te usporedbi s obrascima dobivenim iz stohastičke verzije modela koja opisuje interakcije proteina Rac1 i GAP.

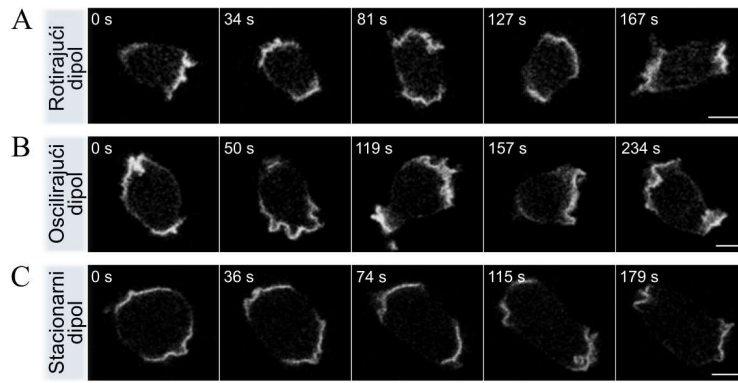
#### 3.1 Rac1-GTP stvara pravilne obrasce u membrani stanice

Kako bismo okarakterizirali dinamiku aktivnosti proteina Rac1 u stanicama *D. dictyostelium*, pratili smo konfokalnom mikroskopijom vegetativne stanice koje eksprimiraju nedavno razvijenu fluorescentnu sondu DPAKa(GBD)-DYFP koja se specifično veže na Rac1-GTP (Marinović *et al.*, 2016). Primijetili smo da je aktivni Rac1 pretežno smješten na membrani, gdje tvori pravilne ili nasumične obrasce koji obično traju nekoliko minuta. Pratili smo 85 stanica koje eksprimiraju DPAKa(GBD)-DYFP i opazili pravilne obrasce u 26 stanica, dok su obrasci u preostalih 59 stanica klasificirani kao nasumični. Pravilni obrasci mogu se podijeliti u tri glavne kategorije: putujući valovi (rotacije), stojni valovi (oscilacije) i stacionarne nehomogene distribucije (polarizacije). U formiranju pravilnih obrazaca najčešće sudjeluje jedna membranska domena na kojoj je obogaćen Rac1-GTP (aktivna domena), no zabilježili smo i slučajeve u kojima sudjeluju dvije takve domene. Stoga, opažene obrasce konačno dijelimo u 6 kategorija: rotirajući monopoli,  $n = 14$  (Slika 3-1A), rotirajući dipoli,  $n = 3$

(Slika 3-2A), oscilirajući monopoli,  $n = 5$  (Slika 3-1B), oscilirajući dipoli,  $n = 2$  (Slika 3-2B), stacionarni monopoli,  $n = 4$  (Slika 3-1C), i stacionarni dipoli,  $n = 1$  (Slika 3-2C). Tipični putujući val DPAKa(GBD)-DYFP okarakteriziran je šiljastom distribucijom približno konstantne amplitude koja se kreće duž membrane konstantnom brzinom (Slika 3-1D). Prosječni period putujućih valova je  $190 \pm 40$  s (srednja vrijednost  $\pm$  std). Tipični stojni val karakterizira periodički prijenos DPAKa(GBD)-DYFP signala s jedne strane na suprotnu stranu stanice. Tijekom prijenosa, dio označenog Rac1 transportira se duž membrane - formiraju se dvije manje domene s povišenom koncentracijom koje putuju membranom u suprotnim smjerovima, stvarajući međustanje s dva maksimuma (Slika 3-1B i E, vremenska točka 33 s). Za stojne valove prosječni period je  $140 \pm 20$  s. U stabilno polariziranoj stanici, relativni položaj membranske domene obogaćene s DPAKa(GBD)-DYFP ne mijenja se tijekom razdoblja od nekoliko minuta (Slika 3-1C i F).



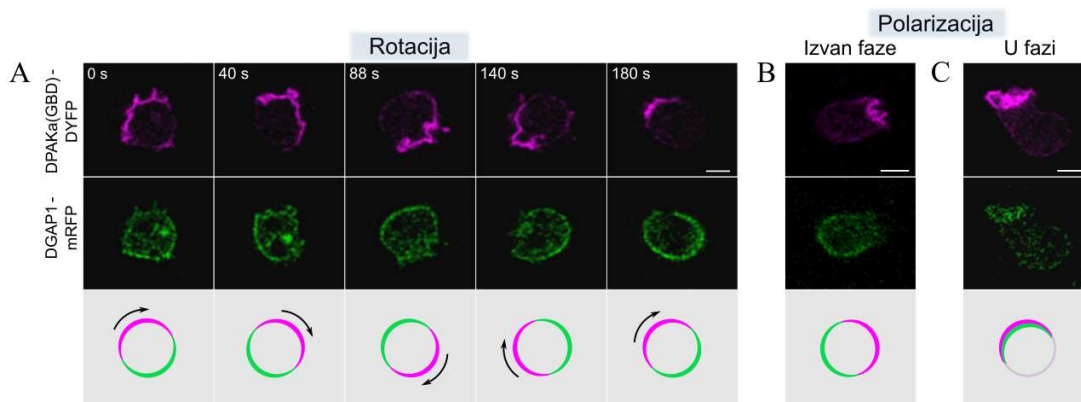
**Slika 3-1. Reprezentativni monopolarni obrasci kortikalnih domena označenih fluorescentnom sondom za aktivni Rac1, DPAKa(GBD)-DYFP.** (A) *Gore* Mikroskopijske slike koje prikazuju rotirajući monopol, odnosno rotaciju jedne membranske domene obogaćene sondom za aktivni Rac1 (svijetli dio membrane). *Dolje* Ilustrativni prikaz istog rotirajućeg monopola, gdje je strelicama naznačen smjer kretanja aktivne domene (prikazana crnom bojom). (B) *Gore* Mikroskopijske slike koje prikazuju oscilirajući monopol, odnosno periodično premještanje aktivne domene s jedne strane na suprotnu stranu stanične membrane. *Dolje* Ilustrativni prikaz istog oscilirajućeg monopola. (C) *Gore* Mikroskopijske slike koje prikazuju stacionarni monopol. Aktivna domena zadržava se nekoliko minuta na prednjoj strani stabilno polarizirane stanice, koja se tijekom tog vremena kreće u jednom smjeru. *Dolje* Ilustrativni prikaz istog stacionarnog monopola. Strelicom je naznačen smjer kretanja stanice. (D-F) Grafovi ovisnosti intenziteta DPAKa(GBD)-DYFP o položaju na membrani u tri vremenske točke: (D) rotirajući monopol, (E) oscilirajući monopol, (F) stacionarni monopol. Mjerila: 5  $\mu$ m.



Slika 3-2. **Reprezentativni bipolarni obrasci kortikalnih domena označenih fluorescentnom sondom za aktivni Rac1, DPAKa(GBD)-DYFP.** (A) *Rotirajući dipol*: rotacija dviju domena. (B) *Oscilirajući dipol*: dvije domene smještene na suprotnim stranama periodički mijenjanju orijentaciju. (C) *Stacionarni dipol*: dvije stacionarne domene smještene na suprotnim stranama nekoliko minuta ne mijenjaju položaj. Mjerila: 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 Obrasci Rac1-GTP i DGAP1 pretežno su antikorelirani

Kako bismo usporedili dinamiku aktivnog Rac1 i njegovog efektora DGAP1, pratili smo stanice koje istovremeno eksprimiraju DPAKa(GBD)-DYFP i DGAP1-mRFP. Otkrili smo da obje sonde tvore iste vrste obrazaca; oscilacije, rotacije (Slika 3-3A), i stabilna polarna stanja (Slika 3-3B). U velikoj većini slučajeva ti su obrasci bili antikorelirani, što se slaže sa objavljenom suprotnom lokalizacijom dviju sondi tijekom slobodnog kretanja stanica (Filić *et al.*, 2012, 2014). Međutim, zabilježili smo nekoliko slučajeva u kojima su se lokalizacije dviju sondi podudarale, odnosno bile pozitivno korelirane, te su obje bile nakupljene na prednjem kraju polariziranih stanica (Slika 3-3C). Od 93 praćene stanice koje eksprimiraju obje probe, u 34 stanice formirani su pravilni obrasci, dok su u 59 stanica fluorescentne probe bile nasumično distribuirane. Opazili smo 20 rotacija (12 monopola i 8 dipola), 9 oscilacija (6 monopola i 3 dipola), 6 polariziranih stanica s dvije probe lokalizirane na suprotnim polovima (4 monopola i 2 dipola) i 2 stanice sa kolokaliziranim probama (1 monopol i 1 dipol). Prosječni period putujućih valova bio je  $200 \pm 50$  s, a stajnih valova  $160 \pm 20$  s. U usporedbi s dinamikom DPAKa(GBD)-DYFP koji je eksprimiran samostalno, ovi rezultati također pokazuju da ekspresija egzogenog DGAP1-mRFP nije bitno utjecala na dinamiku aktivnog Rac1. Sagledani zajedno, naši su eksperimenti demonstrirali generičke pravilne obrasce u membranskoj distribuciji aktivnog Rac1 u nestimuliranim vegetativnim stanicama *D. discoideum*, te njihovu blisku vezu s odgovarajućim, pretežno antikoreliranim obrascima efektoru DGAP1.



Slika 3-3. **Reprezentativni obrasci fluorescentno obilježenih kortikalnih domena u stanicama koje eksprimiraju DPAKa(GBD)-DYFP i DGAP1-mRFP.** (A) *Gore* Mikroskopijske slike koje prikazuju rotirajući monopol. Signal sonde DGAP1-mRFP (zeleno) slabiji je na području obogaćenom DPAKa(GBD)-DYFP (magenta) i obrnuto. *Dolje* Ilustrativni prikaz fluorescentno obilježenih domena koje rotiraju u smjeru kazaljke na satu. (B) *Gore* Mikroskopijske slike koje prikazuju stacionarni monopol. Signal DPAKa(GBD)-DYFP jak je na prednjem kraju, dok se DGAP1-mRFP nalazi uglavnom na stražnjem kraju i bočnim stranama stanice. Prikazana je jedna vremenska točka reprezentativna za distribuciju fluorescencije tijekom intervala od 170 s. *Dolje* Ilustrativni prikaz prostorne raspodjele obiju probi u polarnom stanju. (C) *Gore* Mikroskopijske slike koje prikazuju stanje stacionarnog monopola u kojem su signali obiju sondi najjači su na prednjem kraju stanice. Prikazana je jedna vremenska točka reprezentativna za distribuciju fluorescencije tijekom intervala od 80 s. *Dolje* Ilustrativni prikaz polarnog stanja s jednakim prostornim raspodjelama obiju sondi. Mjerila: 5  $\mu$ m.

### 3.3 Dvokomponentni model (Model I)

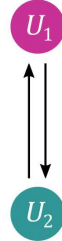
U nekoliko sljedećih potpoglavlja predstavljamo apstraktne matematičke modele koji spadaju u klasu reakcijsko-difuzijskih modela, te u kojima kemijske reakcije podliježu zakonu o djelovanju masa. Nadalje, razmatramo samo linearne i bilinearne reakcije, čije su stope (brzine) matematički opisane izrazima u obliku  $\lambda u$  (linearna stopa) i  $\lambda u_i u_j$  (bilinearna stopa,  $i \neq j$ ), gdje simboli  $\lambda$  i  $u$  redom predstavljaju konstantu brzine reakcije i koncentraciju kemijske tvari. Linearne i bilinearne reakcije odabrali smo jer ih je jednostavno interpretirati u kontekstu relevantnih bioloških procesa, kao što su vezanje proteina na membranu, stvaranje proteinskih kompleksa, kooperativnost, te postojanje pozitivne ili negativne povratne sprege. Još jedna zajednička značajka svih razmatranih modela je sačuvanje mase, odnosno sačuvanje ukupnog broja molekula,  $N = \int (u_1(x, t) + \dots + u_k(x, t)) dx = \text{const}$ . Naime, sinteza i degradacija proteina odvijaju se puno sporije od aktivacije i deaktivacije (npr. u pupajućim kvascima GTPaza Cdc42 polarizira unutar nekoliko minuta, dok se njeno vrijeme polu-života mjeri u satima (Christiano *et al.*, 2014)). Sve modele smo podvrgnuli linearnoj analizi stabilnosti, koja počiva na ideji da se svaka nasumična perturbacija uniformnog stabilnog stanja može rastaviti na Fourierove modove,  $\sim \cos(qx)$ . Sve dok su im amplitude male, svaki od ovih modova raste

ili opada eksponencijalno u vremenu,  $\sim e^{\omega t} \cos(qx)$ , ovisno o predznaku stope rasta (ili, preciznije, o realnom dijelu  $\text{Re } \omega$ ). Pozitivne stope rasta nagovještaju formiranje polarnih ili oscilatornih obrazaca.

Dakle, započinjemo s modeliranjem sustava koji se sastoji od dviju komponenti,  $U_1$  i  $U_2$  (Slika 3-4). Odgovarajuće općenite reakcijsko-difuzijske jednačbe glase:

$$\begin{aligned}\frac{\partial u_1}{\partial t} &= d_1 \frac{\partial^2 u_1}{\partial x^2} - u_1(\lambda_1 + \lambda_{11}u_2) + u_2(\lambda_2 + \lambda_{21}u_1) \\ \frac{\partial u_2}{\partial t} &= d_2 \frac{\partial^2 u_2}{\partial x^2} + u_1(\lambda_1 + \lambda_{11}u_2) - u_2(\lambda_2 + \lambda_{21}u_1).\end{aligned}\tag{3.3.1}$$

Koristeći notaciju iz 2.4, pišemo  $u = (u_1, u_2)^T$ ,  $\mathcal{N}_\Lambda = (n, -n)^T$ , gdje je  $n = -u_1(\lambda_1 + \lambda_{11}u_2) + u_2(\lambda_2 + \lambda_{21}u_1)$ . Reakcijski parametri označeni su simbolima  $\Lambda = \{\lambda_1, \lambda_2, \lambda_{11}, \lambda_{21}\}$ , a difuzijske konstante molekula  $U_1$  i  $U_2$  simbolima  $d_1$  i  $d_2$ . Koncentraciju  $u_1$  možemo interpretirati kao koncentraciju molekula koje se nalaze u citoplazmi, dok simbol  $u_2$  može predstavljati koncentraciju molekula vezanih na membranu. U tom slučaju konstante  $\lambda_1$  i  $\lambda_2$  redom predstavljaju intrinzičnu stopu vezanja molekula  $U_1$  na membranu, te stopu otpuštanja molekula  $U_2$  u citoplazmu. Nelinearni (bilinearni) član s pripadajućom konstantom  $\lambda_{11}$  predstavlja kooperativno vezanje molekula  $U_1$  na membranu. Slično, član s konstantom  $\lambda_{21}$  opisuje otpuštanje molekula  $U_2$  u citoplazmu potpomognuto molekulama  $U_1$ .



Slika 3-4. **Reakcije u dvokomponentnom modelu.**  
Molekula kemijske tvari  $U_1$  (magenta) može se pretvoriti u molekulu kemijske tvari  $U_2$  (zeleno), i obrnuto.

Linearnu analizu stabilnosti započinjemo linearizacijom sustava (3.3.1)

$$\frac{\partial \epsilon}{\partial t} = \mathcal{D} \frac{\partial^2 \epsilon}{\partial x^2} + \mathcal{L}_\Lambda \cdot \epsilon,\tag{3.3.2}$$

gdje je  $\epsilon = (\epsilon_1, \epsilon_2)^T = (u_1 - u_1^0, u_2 - u_2^0)^T$ ;  $u^0 = (u_1^0, u_2^0)$  označava ravnotežno stanje. Jakobijeva matrica dana je izrazom

$$\mathcal{L}_\Lambda = \begin{pmatrix} n^{u_1} & n^{u_2} \\ -n^{u_1} & -n^{u_2} \end{pmatrix}.\tag{3.3.3}$$

Ovdje smo koristili sljedeće definicije:  $n^{u_1} := \left. \frac{\partial n}{\partial u_1} \right|_s$ ;  $n^{u_2} := \left. \frac{\partial n}{\partial u_2} \right|_s$ . Opće rješenje jednadžbe (3.3.2) može se izraziti kao linearna kombinacija partikularnih rješenja oblika  $\epsilon_p(x, t) = ze^{\omega_p t} e^{iqx}$ , gdje  $\omega_p$  i  $z$  redom predstavljaju svojstvenu vrijednost i svojstveni vektor operatora  $\mathcal{L}_\Pi = \mathcal{L}_\Lambda - q^2 \mathcal{D}$ ; simbol  $q$  predstavlja valni broj.

Prije nego odredimo svojstvene vrijednosti operatora  $\mathcal{L}_\Pi$ , pokazat ćemo da sustav (3.3.1) posjeduje jedinstveno ravnotežno stanje, koje je stabilno kada vrijedi  $d_1 = d_2 = 0$ . Za ravnotežna stanja, jednadžbe (3.3.1) svode se na  $n(u) = 0$  i  $-n(u) = 0$ . Ove su dvije jednadžbe linearno zavisne, pa iz njih samih nije moguće odrediti ravnotežno stanje, već ih je potrebno nadopuniti s jednadžbom koja definira ukupan broj molekula, odnosno ukupnu invarijantnu koncentraciju  $c$ :

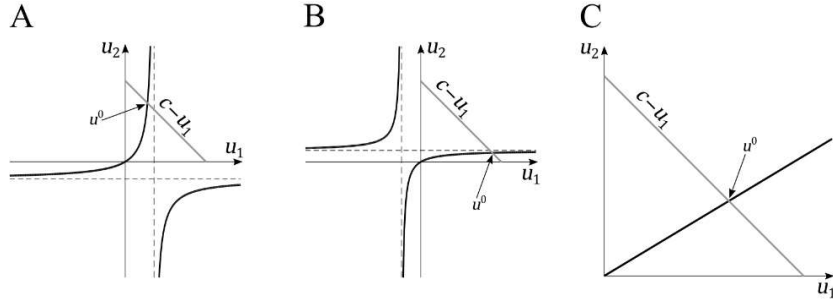
$$\begin{aligned} u_1 + u_2 - c &= 0 \\ u_1(\lambda_1 + \lambda_{11}u_2) - u_2(\lambda_2 + \lambda_{21}u_1) &= 0. \end{aligned} \quad (3.3.4)$$

Jednadžbe (3.3.4) definiraju dvije implicitne krivulje čija, potencijalno višebrojna sjecišta, određuju ravnotežna stanja. Zamijenimo li implicitni oblik jednadžbi (3.3.4) s eksplicitnim izrazom ovisnosti koncentracije  $u_2$  o koncentraciji  $u_1$ , dobit ćemo

$$\begin{aligned} u_2 &= c - u_1 \\ u_2 &= \frac{\lambda_1 u_1}{\lambda_2 - (\lambda_{11} - \lambda_{21})u_1} \end{aligned} \quad (3.3.5)$$

Prva jednadžba definira linearni segment koji spaja točke  $(c, 0)$  i  $(0, c)$ . U razmatranju druge jednadžbe razlikujemo tri slučaja;  $\lambda_{11} > \lambda_{21}$ ,  $\lambda_{11} < \lambda_{21}$ , i  $\lambda_{11} = \lambda_{21}$ . U prva dva slučaja graf funkcije je hiperbola, s horizontalnom asimptotom lociranom u  $u_2 = -\lambda_1/(\lambda_{11} - \lambda_{21})$ , te vertikalnom asimptotom u  $u_1 = \lambda_2/(\lambda_{11} - \lambda_{21})$ . U trećem slučaju graf funkcije je ravna linija  $u_2 = \lambda_1 u_1 / \lambda_2$ . Sva tri slučaja, zajedno s linearnim segmentom iz prve jednadžbe izraza (3.3.5) ilustrirana su na slici 3-5, iz koje je lako vidjeti da sustav posjeduje samo jedno pozitivno ravnotežno stanje, neovisno o vrijednostima konstanti  $\lambda$ .





Slika 3-5. **Model I posjeduje jedinstveno ravnotežno stanje.** (A) Slučaj  $\lambda_{11} > \lambda_{21}$ . Gornja grana hiperbole proteže se I. i III. kvadrantom, prolazeći kroz točku  $(0,0)$ , te jedina siječe linearni odsječak  $u_2 = c - u_1$ . Donja grana hiperbole u potpunosti se proteže IV. kvadrantom. (B) Slučaj  $\lambda_{11} < \lambda_{21}$ . Gornja grana hiperbole nalazi se u II. kvadrantu, dok sada donja grana prolazi I. i III. kvadrantom i točkom  $(0,0)$ , te presijeca linearni odsječak, čime definira jedinstveno ravnotežno stanje. (C) Slučaj  $\lambda_{11} = \lambda_{21}$ . Ravnotežno stanje određeno je sjecištem funkcije  $u_2 = \lambda_1 u_1 / \lambda_2$  i funkcije  $u_2 = c - u_1$ . Asimptote su prikazane iscrtkanim linijama.

Manipulacijom jednadžbi (3.3.5) dobivamo izraz za jedino pozitivno ravnotežno stanje

$$u_1^0 = \frac{c}{2} + \frac{\lambda_1 + \lambda_2 - \sqrt{(c(\lambda_{11} - \lambda_{21}) + \lambda_1 + \lambda_2)^2 - 4c\lambda_2(\lambda_{11} - \lambda_{21})}}{2(\lambda_{11} - \lambda_{21})}$$

$$u_2^0 = \frac{c}{2} - \frac{\lambda_1 + \lambda_2 - \sqrt{(c(\lambda_{11} - \lambda_{21}) + \lambda_1 + \lambda_2)^2 - 4c\lambda_2(\lambda_{11} - \lambda_{21})}}{2(\lambda_{11} - \lambda_{21})}.$$

Sada možemo odrediti svojstvene vrijednosti jakobijana,  $\sigma_{1,2}$ . Vratimo li se matrici (3.3.3), lako je pokazati da vrijedi

$$\sigma_1 = 0$$

$$\sigma_2 = n^{u_1} - n^{u_2}. \quad (3.3.6)$$

Jedna svojstvena vrijednost uvijek je jednaka nuli, neovisno o vrijednostima parametara, dok za drugu svojstvenu vrijednost dobivamo

$$\sigma_2 = n^{u_1} - n^{u_2} = (u_1^0 - u_2^0)(\lambda_{11} - \lambda_{21}) - \lambda_1 - \lambda_2$$

$$= -\sqrt{(c(\lambda_{11} - \lambda_{21}) + \lambda_1 + \lambda_2)^2 - 4c\lambda_2(\lambda_{11} - \lambda_{21})} < 0.$$

Dakle, mala perturbacija ravnotežnog stanja evoluirat će prema izrazu

$$\epsilon(x, t) = \eta_1 z_1 + \eta_2 e^{-|\sigma_2|t} z_2, \quad (3.3.7)$$

gdje su konstante  $\eta_1$  i  $\eta_2$  određene iz početnog uvjeta

$$\epsilon(x, 0) = \epsilon_0 = \eta_1 z_1 + \eta_2 z_2. \quad (3.3.8)$$

Svojstveni vektori  $z_1$  i  $z_2$  su:

$$z_1 = \begin{pmatrix} a \\ 1 \end{pmatrix}, \quad z_2 = \begin{pmatrix} -1 \\ 1 \end{pmatrix},$$

gdje je

$$a = \frac{\lambda_2 - u_1^0(\lambda_{11} - \lambda_{21})}{\lambda_1 + u_2^0(\lambda_{11} - \lambda_{21})}.$$

Ubacivanjem vektora  $z_1$  i  $z_2$  u jednadžbu (3.3.8), te uz uvjet da početna perturbacija čuva ukupnu masu,  $\epsilon_0 = (\epsilon_{01}, \epsilon_{02})^T = (\epsilon_{01}, -\epsilon_{02})^T$ , dobivamo  $\eta_1 = 0$ .

Izraz (3.3.7) sada postaje

$$\epsilon(x, t) = \eta_2 e^{-|\sigma_2|t} z_2,$$

što znači da je ravnotežno stanje stabilno u odsustvu difuzije.

Sada nam preostaje ustanoviti može li difuzija destabilizirati sustav i natjerati ga na stvaranje obrasca (Turingova bifurkacija). Razmatramo proširenu Jacobijevu matricu

$$\mathcal{L}_\Pi = \begin{pmatrix} n^{u_1} - d_1 q^2 & n^{u_2} \\ -n^{u_1} & -n^{u_2} - d_2 q^2 \end{pmatrix}, \quad (3.3.9)$$

čije su svojstvene vrijednosti

$$\omega_{\pm} = \frac{1}{2} \left( \tau \pm \sqrt{\tau^2 - 4\delta} \right),$$

gdje  $\tau$  označava trag, a  $\delta$  determinantu matrice (3.3.9)

$$\tau := \text{tr}(\mathcal{L}_\Lambda - q^2 \mathcal{D}) = (n^{u_1} - n^{u_2}) - (d_1 + d_2)q^2$$

$$\delta := \det(\mathcal{L}_\Lambda - q^2 \mathcal{D}) = (d_1 n^{u_2} - d_2 n^{u_1})q^2 + d_1 d_2 q^4.$$

Obzirom da je  $\sigma_2 = n^{u_1} - n^{u_2} \leq 0$ , možemo konstatirati da vrijedi  $\tau \leq 0$ . Dakle,  $\omega_- = (\tau - \sqrt{\tau^2 - 4\delta})/2 \leq 0$ . Druga svojstvena vrijednost  $\omega_+$  veća je od nule samo ako  $\delta < 0$ , no može se pokazati da tome nikada nije tako, odnosno da vrijedi  $\delta \geq 0$ ,  $\forall c, \Lambda, d_1, d_2$ . Zaključujemo da niti jedna svojstvena vrijednost matrice nikada nije veća od nule, te da sve male perturbacije ravnotežnog stanja trnu s vremenom.

Dakle, linearnom analizom stabilnosti smo pokazali da je ravnotežno stanje sustava (3.3.1) lokalno stabilno. Međutim, ostaje nepoznato što se događa kada se početne koncentracije postave daleko od ravnotežnih. Iako postoje analitičke tehnike za utvrđivanje veličine područja privlačenja (*eng. basin of attraction*) ravnotežnog stanja, one su vrlo često zahtjevne u svojoj primjeni te snažno ovisne o specifičnostima sustava. Stoga smo se u ovom slučaju odlučili numerički riješiti jednadžbe (3.3.1), za početne uvjete postavljene daleko od ravnotežnog stanja, a koji nalikuju tipičnim raspodjelama opaženim u ekperimentima. Simulacije smo proveli na velikom području parametarskog prostora (raspon vrijednosti od  $10^{-4}$  do  $10^{-0}$  za svaku od četiri reakcijske konstante, uz uzorkovanje od dvije točke po redu veličine) i nismo pronašli niti jedan pravilni obrazac, odnosno sustav je konvergirao ka

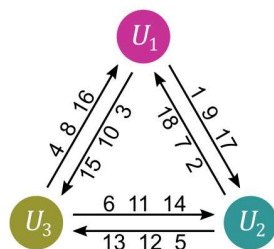
pripadajućem ravnotežnom stanju neovisno o odabranim vrijednostima parametara i početnim uvjetima.

### 3.4 Trokomponentni model (Model II)

Iz prethodne analize može se zaključiti da nije moguće konstruirati dvokomponentni reakcijsko-difuzijski sustav s jednostavnom linearnom i bilinearnom kinetikom reakcija, koji će ispoljavati eksperimentalno opažena dinamička svojstva. Dakle, potrebno je povećati broj komponenti. Sljedeći model koji razmatramo uključuje tri različite kemijske komponente,  $U = \{U_1, U_2, U_3\}$ , i 18 kemijskih reakcija,  $R = \{R_1, R_2, \dots, R_{18}\}$  (Tablica 1, Slika 3-6). Zbog velikog broja reakcija, diferencijalne jednadžbe ćemo zapisati u matričnom obliku (2.4.3).

Tablica 1. **Model II - reakcije.** Kemijske reakcije i njihove stope, te odgovarajući stehiometrijski koeficijenti. Stehiometrijski koeficijenti i stope za suprotni smjer reakcije odvojeni su zarezom.

| Reakcija |                                          | Stehiometrijski koeficijenti |        |        | Stopa reakcije                               |
|----------|------------------------------------------|------------------------------|--------|--------|----------------------------------------------|
|          |                                          | $U_1$                        | $U_2$  | $U_3$  |                                              |
| 1,2      | $U_1 \rightleftharpoons U_2$             | -1, +1                       | +1, -1 | 0,0    | $\lambda_1 u_1, \lambda_2 u_2$               |
| 3,4      | $U_1 \rightleftharpoons U_3$             | -1, +1                       | 0,0    | +1, -1 | $\lambda_3 u_1, \lambda_4 u_3$               |
| 5,6      | $U_2 \rightleftharpoons U_3$             | 0,0                          | -1, +1 | +1, -1 | $\lambda_5 u_2, \lambda_6 u_3$               |
| 7        | $U_1 + U_2 \rightarrow 2U_1$             | +1                           | -1     | 0      | $\lambda_7 u_1 u_2$                          |
| 8        | $U_1 + U_3 \rightarrow 2U_1$             | +1                           | 0      | -1     | $\lambda_8 u_1 u_3$                          |
| 9        | $U_1 + U_2 \rightarrow 2U_2$             | -1                           | +1     | 0      | $\lambda_9 u_1 u_2$                          |
| 10       | $U_1 + U_3 \rightarrow 2U_3$             | -1                           | 0      | +1     | $\lambda_{10} u_1 u_3$                       |
| 11       | $U_2 + U_3 \rightarrow 2U_2$             | 0                            | +1     | -1     | $\lambda_{11} u_2 u_3$                       |
| 12       | $U_2 + U_3 \rightarrow 2U_3$             | 0                            | -1     | +1     | $\lambda_{12} u_2 u_3$                       |
| 13,14    | $U_1 + U_2 \rightleftharpoons U_1 + U_3$ | 0,0                          | -1, +1 | +1, -1 | $\lambda_{13} u_1 u_2, \lambda_{14} u_1 u_3$ |
| 15,16    | $U_1 + U_2 \rightleftharpoons U_2 + U_3$ | -1, +1                       | 0,0    | +1, -1 | $\lambda_{15} u_1 u_2, \lambda_{16} u_2 u_3$ |
| 17,18    | $U_1 + U_3 \rightleftharpoons U_2 + U_3$ | -1, +1                       | +1, -1 | 0,0    | $\lambda_{17} u_1 u_3, \lambda_{18} u_2 u_3$ |



Slika 3-6. Ilustracija mreže reakcija s tri kemijske komponente. Brojevi se odnose na reakcije navedene u Tablici 1. Primjerice, pretvorba komponente  $U_1$  u komponentu  $U_2$  može se odviti reakcijama 1, 9, i 17.

Nelinearnu funkciju  $\mathcal{N}_\Lambda(u)$  zapisujemo na sljedeći način

$$\mathcal{N}_\Lambda(u) = \mathcal{S}r = \begin{pmatrix} s_{11} & s_{12} & \cdots & s_{118} \\ s_{21} & s_{22} & \cdots & s_{218} \\ s_{31} & s_{32} & \cdots & s_{318} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \vdots \\ r_{18} \end{pmatrix},$$

gdje su stehiometrijska matrica  $\mathcal{S}$  i vektor stopa reakcija  $r$  dani sa

$$\mathcal{S} = \begin{pmatrix} -1 & 1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 0 & 0 \end{pmatrix},$$

$$r = (\lambda_1 u_1, \lambda_2 u_2, \lambda_3 u_1, \lambda_4 u_3, \lambda_5 u_2, \lambda_6 u_3, \lambda_7 u_1 u_2, \lambda_8 u_1 u_3, \lambda_9 u_1 u_2, \lambda_{10} u_1 u_3, \lambda_{11} u_2 u_3, \lambda_{12} u_2 u_3, \lambda_{13} u_1 u_2, \lambda_{14} u_1 u_3, \lambda_{15} u_1 u_2, \lambda_{16} u_2 u_3, \lambda_{17} u_1 u_3, \lambda_{18} u_2 u_3)^T.$$

Zbog povećanog broja jednadžbi i broja reakcija više se ne možemo osloniti samo na analitičke metode, pa linearnu analizu stabilnosti provodimo numerički. U tu je svrhu posebno prikladno koristiti matrični zapis reakcija, jer osim što uvelike doprinosi preglednosti programskog koda, pojednostavljuje izdvajanje pojedinih podskupova reakcija koje želimo pobliže analizirati (Okvir 1). S druge strane, iako je principe analize stabilnosti relativno lako implementirati u programski jezik, činjenica da model sadrži 18 slobodnih reakcijskih parametara otežava nam donošenje zaključaka o ponašanju sustava. Broj kombinacija za koje je potrebno napraviti analizu stabilnosti vrlo se brzo penje s brojem parametara. Primjerice, uz raspon vrijednosti pojedinog parametra od 3 reda veličine i uzorkovanje od jedne točke po redu veličine, 18 parametara generirat će  $3^{18} \sim 4 \cdot 10^8$  kombinacija. Uključimo li ovdje i različite vrijednosti difuzijskih konstanti, taj broj postaje još veći. Srećom, za provođenje potrebnih računskih koraka u jednoj točki, današnjim osobnim računalima potreban je djelić sekunde, pa je stoga ipak moguće analizirati sustave s ovako velikim brojem parametara u razumnom vremenskom roku.

Pretragom parametarskog prostora modela II pronašli smo stacionarne (Turingove) bifurkacije. S druge strane, nismo pronašli Hopfove bifurkacije koje bi upućivale na postojanje oscilatornih rješenja. Rezultati simulacija potvrdili su predviđanja linearne analize stabilnosti - trokomponentni model je sposoban generirati polarna stanja nalik onima koja su opažena u eksperimentima, no nije sposoban formirati oscilatorna stanja.

U svrhu detaljnije analize uvjeta pod kojima nastaju stacionarni obrasci u modelu II, ispitali smo ulogu pojedinih reakcija uključenih u model. Najprije smo podijelili mrežu reakcija na manje podjedinice, i tako generirali niz jednostavnijih trokomponentnih modela koje smo pojedinačno podvrgnuli linearnoj analizi stabilnosti. Započeli smo s modelima koji se sastoje od tri reakcije, jer to su najjednostavniji modeli koji uključuju sve tri kemijske komponente. Na prvi pogled ima ih mnogo, budući da postoji  $18!/15!3! = 816$  različitih načina za odabrati 3 reakcije iz skupa od 18 reakcija. No, zahvaljujući simetrijama trokomponentnog sustava većina je kombinacija redundantna, pa ih stoga nije potrebno zasebno analizirati. Njihovim izbacivanjem, konačan broj kombinacija pada na 11 (vidi Okvir 2). U programskoj platformi Matlab smo proveli linearnu analizu stabilnosti svih 11 verzija modela s tri reakcije, i nismo pronašli tražene stacionarne bifurkacije, niti smo nakon provedenih simulacija naišli na stabilna nehomogena stanja.

**Okvir 1: Linearna analiza stabilnosti u Matlab-u**

Uzmimo za primjer podskup reakcija  $P: = \{R_4, R_9, R_{12}\}$ . Matricu

$$S = \begin{pmatrix} -1 & 1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 1 & -1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 0 & 0 \end{pmatrix},$$

i vektor

$$r = (\lambda_1 u_1, \lambda_2 u_2, \lambda_3 u_1, \lambda_4 u_3, \lambda_5 u_2, \lambda_6 u_3, \lambda_7 u_1 u_2, \lambda_8 u_1 u_3, \lambda_9 u_1 u_2, \lambda_{10} u_1 u_3, \lambda_{11} u_2 u_3, \lambda_{12} u_2 u_3, \lambda_{13} u_1 u_2, \lambda_{14} u_1 u_3, \lambda_{15} u_1 u_2, \lambda_{16} u_2 u_3, \lambda_{17} u_1 u_3, \lambda_{18} u_2 u_3)^T,$$

zamijenjujemo s matricom

$$S_P = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix},$$

i vektorom

$$r_P = (\lambda_4 u_3, \lambda_9 u_1 u_2, \lambda_{12} u_2 u_3)^T.$$

Množenjem zadnja dva izraza dobivamo funkciju

$$S_P \cdot r_P = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \lambda_4 u_3 \\ \lambda_9 u_1 u_2 \\ \lambda_{12} u_2 u_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \lambda_4 u_3 - \lambda_9 u_1 u_2 \\ \lambda_9 u_1 u_2 - \lambda_{12} u_2 u_3 \\ -\lambda_4 u_3 + \lambda_{12} u_2 u_3 \end{pmatrix} = \mathcal{N}_P(u).$$

Zbog toga što su jednadžbe  $\mathcal{N}_P(u) = 0$  linearno zavisne, da bismo odredili ravnotežna stanja, moramo im pridodati jednadžbu koja definira ukupan broj molekula  $N$ , odnosno ukupnu invarijantnu koncentraciju  $c = N/L$ . Pišemo

$$u_1 + u_2 + u_3 - c = 0$$

$$\lambda_4 u_3 - \lambda_9 u_1 u_2 = 0$$

$$\lambda_9 u_1 u_2 - \lambda_{12} u_2 u_3 = 0.$$

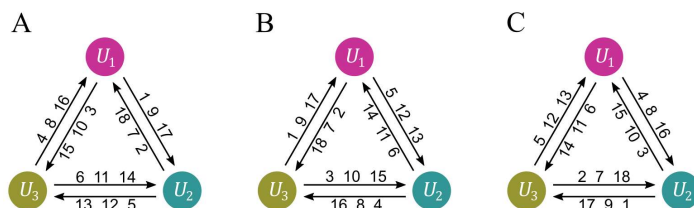
Ove se jednadžbe u Matlab-u mogu riješiti simbolički (`solve`) ili numerički (`fsolve`). Simbolički algoritam pronalazi sva ravnotežna stanja, te ih izražava u simboličkom obliku

$$u^{\alpha 0} = \left( \frac{\lambda_{12} c - \lambda_4}{\lambda_9 + \lambda_{12}}, \frac{\lambda_4}{\lambda_{12}}, \frac{\lambda_9 \lambda_{12} c - \lambda_4 \lambda_9}{\lambda_{12}^2 + \lambda_9 \lambda_{12}} \right), u^{\beta 0} = (c, 0, 0), u^{\gamma 0} = (0, c, 0).$$

Dakle, sustavu pripadaju tri ravnotežna stanja  $u^{\alpha 0}$ ,  $u^{\beta 0}$ , i  $u^{\gamma 0}$ , čiju stabilnost određujemo računajući svojstvene vrijednosti proširene jakobijan matrice, za što koristimo funkcije `jacobian` i `eig`. Iako ovakav pristup rezultira simboličkim izrazima svojstvenih vrijednosti  $\omega$ , zbog njihove izrazite složenosti gotovo je nemoguće napraviti sistematičnu analizu parametarskog prostora i izdvojiti područja u kojima  $\text{Re } \omega > 0$ . Zbog toga je na kraju ipak potrebno izvrijedniti simboličke izraze unosom konkretnih numeričkih vrijednosti parametara. Alternativni, i puno brži pristup je unijeti numeričke vrijednosti odmah na početku, kada se određuje ravnotežno stanje i kada su simbolički izrazi puno jednostavniji. Međutim, algoritam `fsolve`, polazeći od zadanih početnih vrijednosti, iterativnim postupkom pronalazi samo jedno od rješenja. Da bismo pronašli ostala ravnotežna stanja potrebno je postupak pokrenuti ponovno, s drugim inicijalnim vrijednostima.

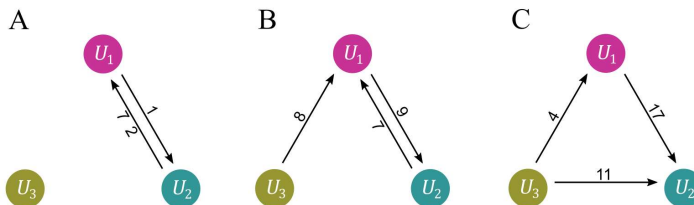
## Okvir 2: Simetrije modela II

Da bismo analizirali manje trokomponentne modele s  $m < 18$  reakcija, ne moramo zasebno analizirati sve moguće kombinacije od  $m$  reakcija uzetih iz skupa  $\{R_1, R_2, \dots, R_{18}\}$ . Naime, potpunu mrežu reakcija čine 2 komplementarna ciklusa; jedan usmjeren u smjeru kazaljke na satu, te drugi sa smjerom obrnutim od smjera kazaljke na satu (Slika 3-7A). Dakle, mreža reakcija zrcalno je simetrična. Nadalje, mreža reakcija također posjeduje rotacijsku simetriju trećeg reda, jer rotacijom imena reakcija (ili imena komponenti) za 120, odnosno 240 stupnjeva, nastaju još dvije ekvivalentne mreže (Slika 3-7B,C). Obje vrste simetrija mogu nam poslužiti da značajno umanjimo broj kombinacija za koje je potrebno provesti linearnu analizu stabilnosti. Primjerice, za podskupove koji se sastoje od tri reakcije,  $m = 3$ , ukupan broj mogućih kombinacija je  $18!/3! (18 - 3)! = 816$ , no odbacivanjem redundantnih simetričnih kombinacija preostaje ih 138.



Slika 3-7. **Zrcalna i rotacijska simetrija.** (A) Originalna orijentacija. Mreža se sastoji od dva komplementarna skupa od 9 reakcija, koji čine dva zrcalna ciklusa. Primjerice, kombinacija 1,5,4 ekvivalentna je kombinaciji 3,5,2 iz suprotno usmjerenog ciklusa. (B) Reakcije zarotirane za 120 stupnjeva u odnosu na komponente. (C) Reakcije zarotirane za 240 stupnjeva u odnosu na komponente. Npr. kombinacija 1,12,8 iz (A) mijenja ime u kombinaciju 5,8,9 u (B), te u kombinaciju 4,9,12 u (C) - te su kombinacije ekvivalentne.

Srećom, ovu brojku možemo dodatno umanjiti. Naime, one kombinacije reakcija za koje se koncentracija neke od kemijskih komponenti ne mijenja, ili mijenja u samo jednom smjeru, vode ka trivijalnim ishodima (Slika 3-8). Nakon što i njih odbacimo dolazimo do konačne brojke od 11 kombinacija.



Slika 3-8. **Primjeri lošeg odabira reakcija.** (A) Jedna kemijska komponenta isključena je iz mreže reakcija. (B) Obzirom da niti jedna strelica nije usmjerena u komponentu  $U_3$ , s vremenom će sve molekule te tvari biti pretvorene u  $U_1$ , čime se  $U_3$  isključuje iz mreže. (C) Zbog toga što niti jedna strelica ne izlazi iz komponente  $U_2$ , sve molekule  $U_1$  i  $U_3$  s vremenom će biti pretvorene u molekule  $U_2$ .

Nakon analize svih kombinacija s 3 reakcije, prelazimo na modele koji uključuju 4 od 18 mogućih reakcija. Ukupan broj takvih modela je  $18!/14! 4! = 3060$ , no većinu njih nije potrebno analizirati. Kao i prije, za svaku kombinaciju postoji i njoj zrcalno simetrična kombinacija, koju možemo izbaciti iz analize (osim onih koje su identične svom zrcalnom paru). Također, one kombinacije reakcija za koje se broj molekula neke od kemijskih komponenti ne mijenja, ili mijenja u samo jednom smjeru, vode ka trivijalnim ishodima. I na

kraju, kada izbacimo i rotacijski simetrične kombinacije, dolazimo na konačan broj od 153 kombinacije. Svih 153 modela podvrgnuli smo linearnoj analizi stabilnosti, a za one modele i mjesta u parametarskom prostoru za koje je ta analiza upućivala na mogućnost nastanka obrazaca, napravili smo dodatnu provjeru pokretanjem simulacija. Postojanje obrazaca potvrdili smo za nekoliko kombinacija reakcija (Tablica 2), čime su odgovarajući modeli ujedno postali i najjednostavniji modeli koji su sposobni generirati stacionarne nehomogene obrasce; kakve smo pronašli analizirajući potpuni model s 18 uključenih reakcija.

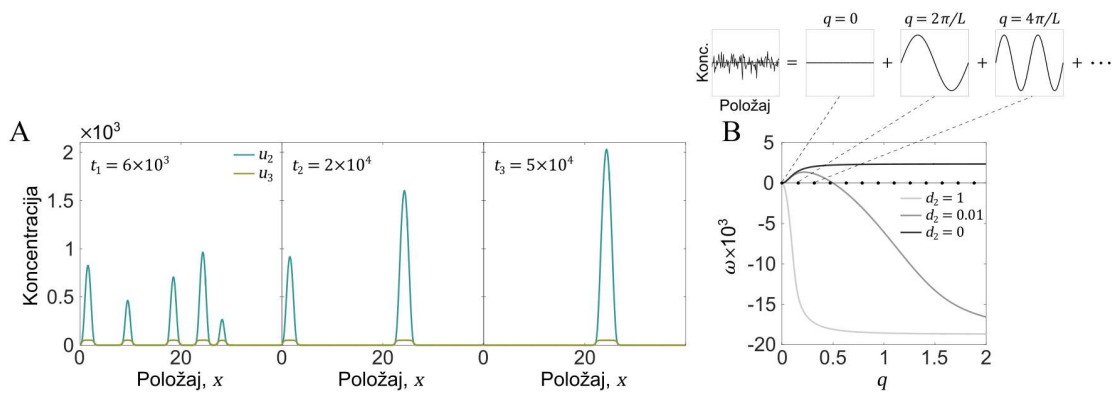
Tablica 2. **Inačice modela II s 4 reakcije kod kojih smo pronašli obrasce.** Svi modeli posjeduju više od jednog ravnotežnog stanja, a do pojave nestabilnosti dolazi za visoke vrijednosti  $d_1$  u odnosu na vrijednosti ostalih difuzijskih konstanti.

| Kombinacija | Broj st. stanja | Uvjet              |
|-------------|-----------------|--------------------|
| 2,6,10,12   | 3               | $d_1 \gg d_3$      |
| 2,6,12,17   | 3               | $d_1 \gg d_3$      |
| 2,8,11,15   | 4               | $d_1 \gg d_2$      |
| 5,8,9,11    | 3               | $d_1 \gg d_2, d_3$ |
| 2,4,11,15   | 3               | $d_1 \gg d_2$      |

Svaki od modela navedenih u tablici 2 ima vrlo slična svojstva. Za početak, svaka kombinacija reakcija sadrži barem dvije reakcije s nelinearnim stopama. Zatim, svim modelima pripada više ravnotežnih stanja, no samo za jedno od njih,  $u^{a0}$ , odgovarajuća krivulja rasta može promijeniti karakter promjenom vrijednosti parametara, čime se nagovještava stvaranje obrasca. Ta krivulja uvijek započinje u nuli ( $\text{Re } \omega_{\Pi}(0) = 0$ ), odnosno radi se o nestabilnosti tipa II. Nadalje, do nestabilnosti dolazi pod uvjetom da je difuzijska konstanta  $d_1$  puno veća od barem jedne od preostale dvije difuzijske konstante. Zatim, jedna od koncentracija  $u_2$  i  $u_3$  uvijek formira plato obrazac (*eng. mesa*), s karakterističnom oštrom podjelom prostorne domene na intervale s niskim te intervale s visokim vrijednostima. Zanimljivo, to je uvijek ona koncentracija čiju vrijednost smanjuju dvije različite reakcije. Druga koncentracija može poprimiti ili šiljastu ili plato raspodjelu, ovisno o vrijednostima  $d_1$ ; za manje  $d_1$  nastaje plato, a za veće  $d_1$  nastaje vrh. Visina i širina vrha snažno ovise o vrijednostima  $d_2$  i  $d_3$ ; njihovim smanjivanjem visina raste a širina se smanjuje. Istodobno, plato obrazac se širi, no njegova visina se ne mijenja, već ostaje na konstantnoj vrijednosti koja je približno jednaka koncentraciji u ravnotežnom stanju  $u^{a0}$ .



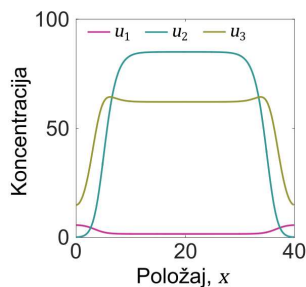
Osim osnovnih tipova obrazaca, s jednom jasno definiranom polarnom zonom, pronašli smo još i prijelazna multipolarna stanja - više različitih područja s povišenom koncentracijom kompetira za masu, sve dok ne preostane samo jedno područje kao „pobjednik“ (Slika 3-9A). Dinamika ovog tipa poznata je pod nazivom 'winner takes all'. Zanimljivo, linearna analiza stabilnosti otkriva da broj nestabilnih Fourierovih modova, koji direktno utječe na broj inicijalno formiranih polova, raste sa smanjenjem vrijednosti  $d_2$  i  $d_3$ ; za  $d_2 = d_3 = 0$  svi su modovi nestabilni (Slika 3-9B). Na vrijeme kompeticije pak utječu vrijednosti svih parametara (do fuzioniranja polova dolazi i u slučaju kada je  $d_2 = d_3 = 0$ ). Generalno, povećanje vrijednosti difuzijskih koeficijenata smanjuje vrijeme fuzioniranja polova.



Slika 3-9. **Rezultati simulacija i linearne analize stabilnosti modela s reakcijama 2,4,11,15.** (A) Grafovi ovisnosti koncentracija  $u_2$  (zeleno) i  $u_3$  (žuto) o položaju, za tri vremenske točke ( $u_1$  nije prikazan jer  $u_1 \ll u_2, u_3$ ). Početni uvjeti postavljeni su u ravnotežne vrijednosti na koje je dodan bijeli Gauss-ov šum ( $snr = 30$  dB, gdje  $snr$  predstavlja omjer signal-šum). (Lijevo) Nakon početnog perioda s približno homogenim raspodjelama, formirala su se dva manja klastera domena s povišenim koncentracijama. Prvi se klaster sastojao od dva vrha u koncentraciji  $u_2$ , odnosno dva platoa u koncentraciji  $u_3$ , dok su se u drugom klasteru nalazila tri vrha i tri platoa. Svi su vrhovi bili različitih visina i širina. S druge strane, platoi su se razlikovali samo po svojim širinama. (Sredina) Kako je vrijeme odmicalo, zbog kompeticije među vrhovima, u oba su klastera prevladali oni najveći, koji su 'konzumirali' susjedne manje vrhove. (Desno) Preostala dva velika vrha koegzistirala su još neko vrijeme, dok ponovno veći nije preuzeo svu materiju iz manjeg, i tako formirao konačno monopolarno stanje. (B) Krivulje rasta za tri različite vrijednosti  $d_2$ . Za relativno velike  $d_2$ , stope rasta su negativne za sve  $q$ , odnosno ravnotežno stanje  $u^{a0}$  je stabilno. Za manje  $d_2$  neki valni brojevi imaju pozitivne stope rasta, a za  $d_2 = 0$  svim valnim brojevima pripadaju pozitivne stope rasta. Vrijednosti ostalih parametara su (bez mjernih jedinica):  $\lambda_2 = 0.01$ ,  $\lambda_4 = 5 \cdot 10^{-3}$ ,  $\lambda_{11} = 2 \cdot 10^{-4}$ ,  $\lambda_{15} = 0.01$ ,  $c = N/L = 120$ ,  $d_1 = 30$ , (A)  $d_2 = 10^{-4}$ ,  $d_3 = 10^{-4}$ , (B)  $d_3 = 0$ .

Još jedna od zajedničkih karakteristika analiziranih sustava jest pojava stabilnih obrazaca u djelovima parametarskog prostora na kojima to nije predviđeno linearnom analizom stabilnosti. Već smo govorili o mogućnosti nastanka obrasca ako se početni uvjeti postave dovoljno daleko od stabilnog ravnotežnog stanja. Ta karakteristika sustava - kada je nastajanje obrasca moguće pokrenuti velikim perturbacijama, a dok sve male perturbacije trnu s vremenom - naziva se pobudljivost (eng. *excitability*) (Slika 3-10). Dakle, radi se o nešto drugačijem mehanizmu formiranja obrazaca, u kojem difuzija ne mijenja stabilnost

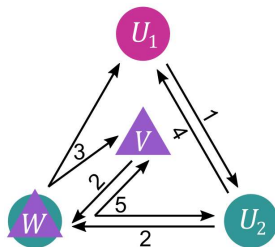
ravnotežnog stanja, kao što je to slučaj kod Turingove bifurkacije, no mijenja topološku strukturu krivulja u faznom prostoru i tako dovodi do kvalitativne promjene u ponašanju dinamičkog sustava. Te se promjene odvijaju dovoljno daleko od stabilnog ravnotežnog stanja da ne utječu na tokove putanja u njegovoj blizini - obrazac je lokalni atraktor.



Slika 3-10. **Pobudljivost.** Velike perturbacije dovode do formiranja obrasca za  $d_1 = 0.18 < d_1^c \sim 0.25$ , gdje  $d_1^c$  predstavlja kritičnu vrijednost na kojoj dolazi do Turingove bifurkacije. Sve koncentracije tvore plato. Ostale vrijednosti parametara su (bez mjernih jedinica):  $k_2 = 8.7 \cdot 10^{-3}$ ,  $k_4 = 4.3 \cdot 10^{-3}$ ,  $k_{11} = 1.4 \cdot 10^{-4}$ ,  $k_{15} = 7.1 \cdot 10^{-3}$ ,  $d_2 = 0.003$ ,  $d_3 = 0.01$ ,  $c = 120$ .

### 3.5 Četverokomponentni model (Model III)

U prethodnom poglavlju smo analizirali model s tri kemijske komponente i identificirali minimalni broj reakcija potrebnih za stvaranje stacionarnih obrazaca. S druge strane, nismo pronašli stabilne oscilatorne obrasce. Umjesto da nastavimo s proučavanjem ovakve vrste modela, i samo povećamo broj komponenti, u ovom ćemo poglavlju analizirati sustav u kojem se dvije komponente mogu zajedno vezati u kompleks. Model se sastoji od ukupno četiri kemijske komponente koje označavamo simbolima  $U_1$ ,  $U_2$ ,  $V$ ,  $W$ . Kao i u modelima I i II, dozvoljena je kemijska pretvorba između osnovnih komponenti  $U_1$  i  $U_2$ . Molekula  $V$  može vezati jednu od osnovnih komponenti i tako formirati kompleks  $W$ , koji se potom raspada na  $V + U_1$  ili  $V + U_2$  (Slika 3-11).



Slika 3-11. **Ilustracija mreže reakcija s četiri kemijske komponente.** Kemijska tvar  $U_1$  može se pretvoriti u tvar  $U_2$ , i obrnuto. Također, može doći do stvaranja kompleksa između komponenti  $U_2$  i  $V$  (ekvivalentna mreža nastaje u slučaju da  $V$  veže  $U_1$  umjesto  $U_2$ ). Ne postoji zrcalna niti rotacijska simetrija. Brojevi naznačuju samo grupe reakcija.

U tablici 3 popisane su sve reakcije, pripadajući stehiometrijski koeficijenti i reakcijske stope uključene u model. Linearnom analizom stabilnosti i simulacijama utvrdili smo postojanje stacionarnih i oscilatornih obrazaca. Nakon toga smo primijenili već korištenu taktiku, te pokušali ustanoviti minimalni broj reakcija koje moraju biti uključene u model, a da dinamička svojstva nalikuju onima u eksperimentu. Mreža reakcija sastavljena je od pet osnovnih grupa. Svaka se grupa sastoji od četiri reakcije, osim grupe 2 koja sadrži samo jednu reakciju. Kao i prije, da bismo izbjegli trivijalne ishode, bilo koji podskup reakcija koji odaberemo mora biti takav da se koncentracija svake od kemijskih komponenti može mijenjati u oba smjera. Grafički, to odgovara situaciji u kojoj za svaku komponentu postoji strelica koja u nju ulazi ali i strelica koja iz nje izlazi.

Tablica 3. **Model III - reakcije.** Kemijske reakcije, stope reakcija, te odgovarajući stehiometrijski koeficijenti. Stehiometrijski koeficijenti i stope za suprotni smjer reakcije odvojeni su zarezom.

| Reakcija           |                                      | Stehiometrijski koeficijenti |          |          |          | Stopa reakcije                                 |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------|----------|----------|------------------------------------------------|
|                    |                                      | $U_1$                        | $U_2$    | $V$      | $W$      |                                                |
| $1\alpha, 4\alpha$ | $U_1 \rightleftharpoons U_2$         | $-1, +1$                     | $+1, -1$ | $0, 0$   | $0, 0$   | $\lambda_{1\alpha}u_1, \lambda_{4\alpha}u_2$   |
| $1\beta$           | $U_1 + U_2 \rightarrow 2U_2$         | $-1$                         | $1$      | $0$      | $0$      | $\lambda_{1\beta}u_1u_2$                       |
| $4\beta$           | $U_1 + U_2 \rightarrow 2U_1$         | $+1$                         | $-1$     | $0$      | $0$      | $\lambda_{4\beta}u_1u_2$                       |
| $1\gamma, 4\gamma$ | $U_1 + V \rightleftharpoons U_2 + V$ | $-1, +1$                     | $+1, -1$ | $0, 0$   | $0, 0$   | $\lambda_{1\gamma}u_1v, \lambda_{4\gamma}u_2v$ |
| $1\delta, 4\delta$ | $U_1 + W \rightleftharpoons U_2 + W$ | $-1, +1$                     | $+1, -1$ | $0, 0$   | $0, 0$   | $\lambda_{1\delta}u_1w, \lambda_{4\delta}u_2w$ |
| $2, 5\alpha$       | $U_2 + V \rightleftharpoons W$       | $0, 0$                       | $-1, +1$ | $-1, +1$ | $+1, -1$ | $\lambda_{2\alpha}u_2v, \lambda_{5\alpha}w$    |
| $5\beta$           | $W + U_1 \rightarrow U_2 + V + U_1$  | $0$                          | $+1$     | $+1$     | $-1$     | $\lambda_{5\beta}u_1w$                         |
| $5\gamma$          | $W + U_2 \rightarrow 2U_2 + V$       | $0$                          | $+1$     | $+1$     | $-1$     | $\lambda_{5\gamma}u_2w$                        |
| $5\delta$          | $W + V \rightarrow U_2 + 2V$         | $0$                          | $+1$     | $+1$     | $-1$     | $\lambda_{5\delta}vw$                          |
| $3\alpha$          | $W \rightarrow U_1 + V$              | $+1$                         | $0$      | $+1$     | $-1$     | $\lambda_{3\alpha}w$                           |
| $3\beta$           | $W + U_1 \rightarrow 2U_1 + V$       | $+1$                         | $0$      | $+1$     | $-1$     | $\lambda_{3\beta}u_1w$                         |
| $3\gamma$          | $W + U_2 \rightarrow U_1 + V + U_2$  | $+1$                         | $0$      | $+1$     | $-1$     | $\lambda_{3\gamma}u_2w$                        |
| $3\delta$          | $W + V \rightarrow U_1 + 2V$         | $+1$                         | $0$      | $+1$     | $-1$     | $\lambda_{3\delta}vw$                          |

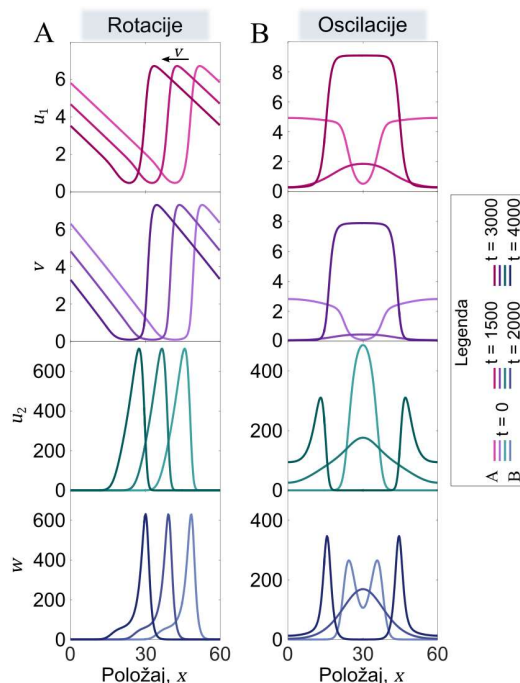
Dakle, ako započnemo s analizom podskupova sačinjenih od tri reakcije moramo odabrati jednu reakciju iz grupe 1, jednu iz grupe 2, te jednu iz grupe 3. Kada bismo odabrali da se raspadanje kompleksa  $W$ , umjesto nekom od reakcija iz grupe 3, odvija pomoću neke od reakcija iz grupe 5, morali bismo u mrežu uključiti i grupu 4, te tako povećati ukupan broj

reakcija. Model III, za razliku od modela II, ne posjeduje niti zrcalnu niti rotacijsku simetriju, pa ne možemo umanjiti broj razmatranih kombinacija reakcija. Od 16 mogućih kombinacija s tri reakcije, kod njih 5 smo pronašli obrasce; stacionarne i oscilatorne (Tablica 4).

Tablica 4. Inačice modela III s 3 reakcije kod kojih smo pronašli stacionarne i oscilatorne obrasce. Obrasci se javljaju za 5 različitih kombinacija reakcija. Svaka inačica posjeduje više ravnotežnih stanja.

| Kombinacija           | Broj stac. stanja |
|-----------------------|-------------------|
| $1\beta, 2, 3\alpha$  | 3                 |
| $1\beta, 2, 3\beta$   | 3                 |
| $1\alpha, 2, 3\delta$ | 3                 |
| $1\beta, 2, 3\delta$  | 4                 |
| $1\delta, 2, 3\delta$ | 3                 |

U modelu s reakcijama  $1\beta, 2, 3\alpha$  pronašli smo netrivialna rješenja samo uz  $d_1 \gg d_2$ . Ovako jednostavan uvjet vrijedi samo za navedenu kombinaciju, dok je kod ostalih kombinacija situacija kompleksnija. Primjerice, za reakcije  $1\alpha, 2, 3\delta$  i visoke vrijednosti  $d_1$  u odnosu na ostale difuzijske konstante, pronašli smo samo stacionarne obrasce, dok se oscilatorna rješenja pojavljuju pri niskim vrijednostima  $d_1$  u odnosu na ostale difuzijske konstante. Unatoč nekim razlikama, sustavi iz tablice 4 imaju mnogo toga zajedničkog, a neka svojstva dijele i sa sustavima koje smo analizirali u modelu II. Ponovno, svi modeli sadrže barem dvije reakcije s nelinearnim stopama. Zatim, za svaku kombinaciju reakcija vrijedi da barem jedna krivulja rasta započinje s pozitivnim vrijednostima. Također, vrijedi da u nuli započinje barem jedna, a najviše dvije krivulje rasta. U slučaju da se radi o dvije takve krivulje, jedna od njih uvijek poprima negativne vrijednosti za sve  $q > 0$ . Druga krivulja, prelaskom kritične vrijednosti jedne od difuzijskih konstanti, poprima pozitivne vrijednosti na nekom intervalu  $(0, q_{max})$ . U modelu II taj je prelazak označavao Turingovu bifurkaciju, no u ovom se modelu može raditi i o Hopfovoj bifurkaciji ili o Turing-Hopfovoj bifurkaciji (Okvir 3) (Just *et al.*, 2001; Song, Jiang and Yuan, 2019). Rezultati simulacija pokazuju da navedene bifurkacije mogu dovesti do spontanog formiranja polarnih stanja, putujućih valova (Slika 3-12A), i stajinih valova (Slika 3-12B). Također, uz povoljne početne uvjete, sustav formira tranzijentna multipolarna stanja, čije su karakteristike ipak nešto drugačije od karakteristika sličnih stanja koja je formirao model II (Slika 3-13). Osim tranzicije iz multipolarnog u monopolarno stanje, opazili smo i prijelaze iz monopolarnog stanja u putujući val, te iz stajinog vala u putujući val.

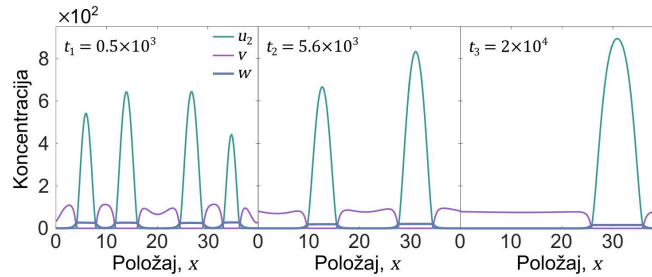


Slika 3-12. Putujući valovi (rotacije) i stojni valovi (oscilacije) koje generira model čiju mrežu čine reakcije  $1\beta$ ,  $2$ ,  $3\alpha$ . Valovi su prikazani kao grafovi koncentracija u ovisnosti o položaju za tri vremenske točke. (A) Putujući valovi koncentracija  $u_2$  i  $w$  imaju formu visokog i uskog vrha, dok su valovi  $u_1$  i  $v$  puno niži. Nakupljanje na uskom prostoru moguće je zbog relativno niskih vrijednosti difuzijskih koeficijenata. Koncentracija  $w$  zaostaje za  $u_2$ . (B) Slično, koncentracije stojnih valova  $u_2$  i  $w$  poprimaju puno veće vrijednosti od  $u_1$  i  $v$ . U trenutku  $t = 0$  i položaju  $x = 0$  koncentracija  $u_2$  je u svom maksimumu, a koncentracija kompleksa  $w$  poprima lokalno minimalnu vrijednost. Porast koncentracije  $w$  istovremeno je popraćen smanjenjem  $u_2$  ( $t = 1500$ ). Nestanak vrha u koncentraciji  $u_2$  popraćen je nastankom novog vrha na položaju pomaknutom za  $L/2$  ( $t = 3000$ ). Vrijednosti parametara su (bez mjernih jedinica):  $\lambda_{1\beta} = 8.3 \cdot 10^{-3}$ ,  $\lambda_2 = 3.5 \cdot 10^{-2}$ ,  $\lambda_{3\alpha} = 1.6 \cdot 10^{-2}$ ,  $c_U = 150$ ,  $c_V = 60$ ,  $L = 40$ ,  $d_V = 2$ ,  $d_W = 0.01$ , (A)  $d_1 = 6.9$ ,  $d_2 = 0.025$ , (B)  $d_1 = 4.2$ ,  $d_2 = 0.03$ . Primjetimo da je period prikazanih valova vrlo dug,  $T \sim 10^4$  vremenskih jedinica. Međutim, vremensku skalu lako je regulirati, i tako odabrati željeni period. Množenje svih reakcijskih i difuzijskih konstanti faktorom  $a$ , ekvivalentno je promjeni vremenske skale; novo vrijeme je  $t' = t/a$ , a novi period  $T' = T/a$ .

Tijekom pregledavanja obrazaca generiranih u simulacijama primijetili smo da su profili putujućih i stojnih valova komponenti koje relativno sporo difundiraju (u primjeru navedenom u slici 3-12 to su komponente  $U_2$  i  $W$ ) najčešće vrlo visoki i uski. Iako se karakteristike valova donekle mogu regulirati variranjem difuzijskih koeficijenata, postoji efikasniji način za uspostavljanje kontrole nad njihovom visinom i širinom. Do sada nismo govorili o interpretaciji pojedinih kemijskih komponenti, no imajući u vidu da zapravo modeliramo kretanje i interakciju proteina u citoplazmi i na membrani stanice, komponente s relativno niskim vrijednostima difuzijskih konstanti možemo interpretirati kao proteine vezane za membranu, dok one komponente koje imaju relativno visoke vrijednosti difuzijskih konstanti interpretiramo kao proteine locirane u citoplazmi. U tom slučaju vrlo visoki i uski

valovi sporih komponenti ukazuju na prekomjerno nakupljanje molekula na uskom području membrane, a koje je moguće ograničiti uvođenjem maksimalnog broja vezivnih mjesta. Matematički se to odražava na stope reakcija vezanja proteina na membranu, koje se množe izrazom  $(1 - u_i/u_i^{max})$ , gdje  $u_i^{max}$  označava maksimalnu vrijednost membranske koncentracije  $u_i$ . Ovakva izmjena jednadžbi, uz efekt snižavanja i širenja valova, također može utjecati i na polarne obrasce. Primjerice, u modelu II, za kombinaciju reakcija 2,4,11,15, uvođenje maksimalne vrijednosti koncentracije  $u_3^{max}$  ima snažan utjecaj na vrijeme kompeticije polova u tranzijentnim multipolarnim stanjima - što je razlika između visine platoa u koncentraciji  $u_3$  i vrijednosti  $u_3^{max}$  veća, to je vrijeme fuzioniranja polova dulje. Slično, u modelu III, za reakcije  $1\beta$ , 2,  $3\alpha$ , vrijeme kompeticije općenito raste s povećanjem vrijednosti  $u_2^{max}$ . U ovom modelu, o vrijednosti  $u_2^{max}$  također ovisi hoće li koncentracija  $u_2$  poprimiti šiljastu ili plato raspodjelu.

Ovime završavamo analizu modela III s tri reakcije, te se nećemo posebno baviti inačicama s više reakcija. Međutim, napominjemo da smo spomenute obrasce također pronašli i u sustavu u koji nije uključena niti jedna reakcija iz grupe 3, već su umjesto toga uključene reakcije iz grupa 4 i 5.

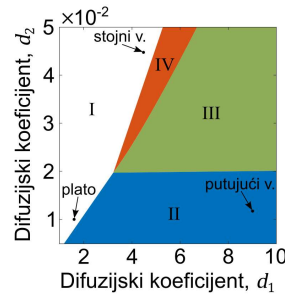


Slika 3-13. **'Winner takes all' dinamika.** *Lijevo* Nakon tranzijentnog perioda s puno manjih vrhova i platoa, formirana su četiri područja s povišenim vrijednostima koncentracija. Koncentracija  $u_1$  nije prikazana jer ima vrlo nisku vrijednost u odnosu na ostale. Koncentracije  $u_2$  i  $w$  redom formiraju šiljaste i plato obrasce koji su u korelaciji; slično koncentracijama  $u_2$  i  $u_3$  u modelu II. Međutim, koncentracija  $v$  nema niti šiljastu niti plato raspodjelu, i u negativnoj je korelaciji s  $u_2$  i  $w$ . *Sredina* Prolaskom vremena dolazi do fuzioniranja domena. Zanimljivo, dva novonastala vrha imaju nešto drugačiji položaj od položaja izvornih vrhova. Platoi u koncentraciji  $w$  su osim širine promijenili i visinu, a obrazac u koncentraciji  $v$  počinje nalikovati na plato. *Desno* Došlo je do konačnog spajanja dviju domena u jednu. Koncentracija  $v$  formirala je plato. Vrijednosti parametara su (bez mjernih jedinica):  $\lambda_{1\beta} = 8.3 \cdot 10^{-3}$ ,  $\lambda_2 = 3.5 \cdot 10^{-2}$ ,  $\lambda_{3\alpha} = 1.6 \cdot 10^{-2}$ ,  $c_U = 150$ ,  $c_V = 60$ ,  $d_1 = 30$ ,  $d_2 = 0.01$ ,  $d_V = 0.02$ ,  $d_W = 0.01$ ,  $L = 40$ .

### Okvir 3: Turing-Hopfova bifurkacija

Prema linearnoj analizi stabilnosti, koju primjenjujemo na jedino ravnotežno stanje koje mijenja svojstva stabilnosti variranjem parametara,  $u^{a0}$ , parametarski prostor svakog modela iz tablice 4 možemo podijeliti na četiri regije: stabilnu, Turing, Hopf, i Turing-Hopf regiju (Slika 3-14). Stabilnu regiju čine one točke parametarskog prostora za koje vrijedi da sve male perturbacije ravnotežnog stanja trnu s vremenom ( $\text{Re } \omega_{\Pi}(q) < 0$  za sve  $q > 0$ ). U Turing regiju spadaju točke za koje postoje nestabilni Fourierovi modovi, ali isključivo s realnim vrijednostima stopa rasta,  $\text{Re } \omega_{\Pi}(q) > 0$  i  $\text{Im } \omega_{\Pi}(q) = 0$  za sve  $q \in (0, q_{max})$ . Hopf regiji pripadaju točke za koje svi nestabilni Fourier modovi posjeduju kompleksne stope rasta,  $\text{Re } \omega_{\Pi}(q) > 0$  i  $\text{Im } \omega_{\Pi}(q) \neq 0$  za  $q \in (0, q_{max})$ . I na kraju, Turing-Hopf regiji pripadaju točke parametarskog prostora u kojima neki nestabilni modovi posjeduju realne, a neki kompleksne stope rasta,  $\text{Re } \omega_{\Pi}(q) > 0$  i  $\text{Im } \omega_{\Pi}(q) = 0$  za  $q \in (0, q_a)$ ;  $\text{Re } \omega_{\Pi}(q) > 0$  i  $\text{Im } \omega_{\Pi}(q) \neq 0$  za  $q \in (q_a, q_{max})$ .

Već smo ustanovili da granice parametarskog prostora unutar kojih je sustav sposoban generirati stacionarne obrasce mogu premašiti granice koje su postavljene linearnom analizom stabilnosti (pobudljivost). Rezultati simulacija modela III dodatno demonstriraju koliko se karakteristike konačnog stanja sustava mogu razlikovati od karakteristika obrazaca koje predviđa linearna analiza stabilnosti. Naime, kada bi se sustav koji se nalazi daleko od ravnotežnog stanja ponašao jednako kao i kada je blizu ravnotežnom stanju, ne bismo mogli pronaći obrasce u stabilnoj regiji. Zatim, u Turing području bi postojali samo stacionarni obrasci, ali ne i oscilatorni. U Hopf regiji bi se pak pojavljivali isključivo oscilatorni obrasci, a u Turing-Hopf području, gdje dolazi do interakcije dviju nestabilnosti, mogli bismo naći obje vrste pravilnih obrazaca. Međutim, u stabilnoj regiji smo pronašli polarna stanja, ali i stojne te putujuće valove. U Turing regiji smo pronašli oscilatorne obrasce, dok smo u Turing-Hopf regiji pronašli samo oscilatorne, ali ne i stacionarne obrasce.



Slika 3-14. **Podjela ravnine  $d_1$ - $d_2$  na stabilnu, Turing, Turing-Hopf i Hopf regiju.** Podjela je napravljena prema karakteristikama stopa rasta Fourierovih modova u blizini ravnotežnog stanja  $u^{a0}$ . Stabilna regija (I) - za vrijednosti parametara koje pripadaju ovoj regiji svi su Fourier modovi stabilni. Turing regija (II) - neki Fourier modovi imaju pozitivne realne stope rasta. Turing-Hopf regija (III) - neki rastući modovi posjeduju realne, a neki kompleksne stope rasta. Hopf regija (IV) - svi rastući Fourier modovi posjeduju kompleksne stope rasta. Na mjestu gdje se sve četiri regije susreću dolazi do nastajanja Turing-Hopf bifurkacije. U regiji I velike perturbacije mogu dovesti do formiranja plato obrasca ( $d_1 = 1.6$ ,  $d_2 = 0.01$ ), ali i oscilatornog obrasca ( $d_1 = 4.5$ ,  $d_2 = 0.045$ ). U regiji II također je moguće pronaći oscilatorne obrasce ( $d_1 = 9$ ,  $d_2 = 0.012$ ). Ostale vrijednosti parametara su (bez mjernih jedinica):  $\lambda_{1\beta} = 8.3 \cdot 10^{-3}$ ,  $\lambda_2 = 3.5 \cdot 10^{-2}$ ,  $\lambda_{3\alpha} = 1.6 \cdot 10^{-2}$ ,  $d_V = 2$ ,  $d_W = 0.01$ ,  $c_U = 150$ ,  $c_V = 60$ .

### 3.6 Rac1-DGAP1 model

Nakon razmatranja općenito formuliranih reakcijsko-difuzijskih modela s malim brojem komponenti, spremni smo konstruirati model koji će opisivati dinamiku proteina Rac1 i njegovog efektora DGAP1. Model se sastoji od dva dijela, odnosno od dva međusobno povezana ciklusa reakcija (Slika 3-15): (i) reakcije između GTPaze Rac1 i njenog negativnog regulatora GAP, te (ii) reakcije između GTPaze Rac1 i njenog efektora DGAP1.

Ciklus (i) u potpunosti se bazira na prethodno analiziranom modelu III. Reakcije iz grupa 1, 2 i 3 tog modela iskoristit ćemo za opis procesa koji se sastoji od pričvršćivanja Rac1 na membranu, njegove aktivacije, pa potom i deaktivacije te otpuštanja u citoplazmu. Taj je proces inače reguliran proteinima GEF, GAP, i GDI, no u model ćemo eksplicitno uključiti samo GAP. Zamjenjujemo oznake linearnih koncentracija komponenti  $u_1$ ,  $u_2$ ,  $v$ , i  $w$  s oznakama  $R_D$ ,  $R_T$ ,  $G$ , i  $G_c$ , koje redom predstavljaju koncentracije neaktivnih proteina Rac1-GDP u citoplazmi, aktivnih Rac1-GTP na membrani, GAP u citoplazmi, i kompleksa Rac1-GAP na membrani. Ciklus (i) opisan je sljedećim skupom reakcijsko-difuzijskih jednažbi:

$$\partial_t R_D = d_{R_D} \partial_{xx} R_D + \lambda_3 G_c - R_D M_R (\lambda_1 + \lambda_{11} R_T + \lambda_{12} G_c) + \lambda_{6b} D_c, \quad (3.6.1)$$

$$\partial_t R_T = d_{R_T} \partial_{xx} R_T + \lambda_{6a} D_c - \lambda_2 R_T G - \lambda_5 R_T D_m + R_D M_R (\lambda_1 + \lambda_{11} R_T + \lambda_{12} G_c), \quad (3.6.2)$$

$$\partial_t G = d_G \partial_{xx} G + \lambda_3 G_c - \lambda_2 R_T G, \quad (3.6.3)$$

$$\partial_t G_c = d_{G_c} \partial_{xx} G_c + \lambda_2 R_T G - \lambda_3 G_c. \quad (3.6.4)$$

Ovdje reakcije uključuju nekoliko koraka (simbol  $\lambda$  označava konstantu brzine reakcije): pričvršćivanje citoplazmatskog Rac1-GDP na membranu i njegovu istovremenu aktivaciju GEF-om (izmjena GDP za GTP),  $\lambda_1$ , pričvršćivanje i aktivaciju stimuliranu membranski vezanim Rac1-GTP,  $\lambda_{11}$ , i Rac1-GAP kompleksom,  $\lambda_{12}$ ; vezanje citoplazmatskog GAP-a na Rac1-GTP što rezultira stvaranjem Rac1-GAP kompleksa,  $\lambda_2$ ; deaktivacija Rac1 unutar Rac1-GAP kompleksa i posljedično otpuštanje obaju proteina u citoplazmu,  $\lambda_3$ . Model opisuje citoplazmatsku difuziju Rac1-GDP i GAP, s odgovarajućim konstantama difuzije označenim simbolima  $d_{R_D}$  i  $d_G$ , te membransku difuziju Rac1-GTP i Rac1-GAP, s konstantama  $d_{R_T}$  i  $d_{G_c}$ . Član  $M_R = 1 - R_T/R_T^{max}$  u jednažbi (3.6.2) osigurava da koncentracija Rac1 proteina na membrani ne može prijeći vrijednost zasićenja,  $R_T^{max}$ .

Ciklus (ii) koji opisuje interakciju molekula Rac1 s molekulama DGAP1 modelirat ćemo pomoću modificirane verzije modela III (u ovom radu ga nećemo zasebno analizirati, no napominjemo da smo linearnom analizom stabilnosti pronašli jedino stacionarne bifurkacije).



Dok se u ciklusu (i) citoplazmatski GAP direktno vezao za aktivni Rac1, u ovom slučaju citoplazmatski DGAP1 prvo se veže na membranu, a tek potom tvori kompleks s aktivnim Rac1. Ova je modifikacija nužna za uspješno reproduciranje fazne razlike između valova Rac1 i DGAP1 na membrani. Dakle, u ciklusu (ii) osim koncentracija neaktivnog i aktivnog proteina Rac1, nalaze se i koncentracije DGAP1 u citoplazmi,  $D$ , DGAP1 vezanih na membranu,  $D_m$ , te kompleksa Rac1-DGAP1,  $D_c$ , kojeg tvore membranski proteini. Ciklus (ii) opisan je sljedećim skupom reakcijsko-difuzijskih jednačbi:

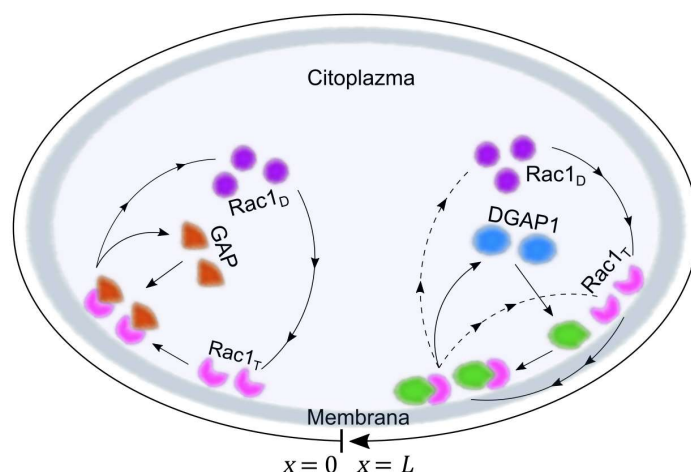
$$\partial_t D = d_D \partial_{xx} D - M_D D (\lambda_4 + \lambda_{41} R_T + \lambda_{42} G_c) + (\lambda_{6a} + \lambda_{6b}) D_c, \quad (3.6.5)$$

$$\partial_t D_m = d_{D_m} \partial_{xx} D_m + M_D D (\lambda_4 + \lambda_{41} R_T + \lambda_{42} G_c) - \lambda_5 R_T D_m, \quad (3.6.6)$$

$$\partial_t D_c = d_{D_c} \partial_{xx} D_c + \lambda_5 R_T D_m - (\lambda_{6a} + \lambda_{6b}) D_c. \quad (3.6.7)$$

Reakcije ovog ciklusa uključuju: pričvršćivanje citoplazmatskog DGAP1 na membranu,  $\lambda_4$ , pričvršćivanje stimulirano Rac1-GTP,  $\lambda_{41}$ , i Rac1-GAP kompleksom,  $\lambda_{42}$ ; stvaranje Rac1-DGAP1 kompleksa iz DGAP1 i Rac1-GTP molekula vezanih na membranu,  $\lambda_5$ ; razgradnju kompleksa Rac1-DGAP1 s dva različita ishoda: otpuštanjem DGAP1 u citoplazmu dok Rac1-GTP ostaje na membrani,  $\lambda_{6a}$ , ili otpuštanjem oba proteina u citoplazmu,  $\lambda_{6b}$ . Odgovarajuće difuzijske konstante označene su simbolima  $d_D$ ,  $d_{D_m}$ , i  $d_{D_c}$ . Član  $M_D = 1 - D_m/D_m^{max}$  u jednačbi (3.6.6) sprječava pretjerano nakupljanje molekula DGAP1 na membrani, s vrijednošću koncentracije zasićenja,  $D_m^{max}$ . Zajedno, jednačbe (3.6.1)-(3.6.7) predstavljaju opis dinamike Rac1, GAP i DGAP1.

Kao i u slučaju svih prethodnih modela, i ovaj model je jednodimenzionalan. Položaj  $x$  interpretiramo kao mjesto na membrani ili u citoplazmi stanice, a koje se nalazi unutar intervala  $[0, L]$ , gdje simbol  $L$  predstavlja opseg stanice. Budući da položaji  $x = 0$  i  $x = L$  odgovaraju istoj fizičkoj točki, postavljamo periodične rubne uvjete za sve koncentracije i njihove prve prostorne derivacije, uključujući one na membrani te one u citoplazmi.



Slika 3-15. **Shematski dijagram mreže interakcija proteina.** Ciklus (i) prikazan je na lijevoj strani i u potpunosti odgovara modelu III. Citoplazmatski Rac1<sub>D</sub> (ljubičasta) neposredno nakon vezanja na membranu prelazi u aktivnu formu, Rac1<sub>T</sub> (magenta). Na aktivni Rac1 može se vezati molekula proteina GAP (smeđa), što naknadno dovodi do deaktivacije Rac1 i raspadanja kompleksa Rac1-GAP, pri čemu se GAP i Rac1 vraćaju u citoplazmu. Ciklus (ii) prikazan je desno. Molekule DGAP1 iz citoplazme (plava) vežu se na membranu (zeleni), gdje tvore kompleks s Rac1<sub>T</sub>. Raspadanjem kompleksa Rac1-DGAP1 molekula DGAP1 otpušta se u citoplazmu, dok molekula Rac1 može biti otpuštena u citoplazmu, ali može i ostati na membrani.

### *Obrasci generirani modelom*

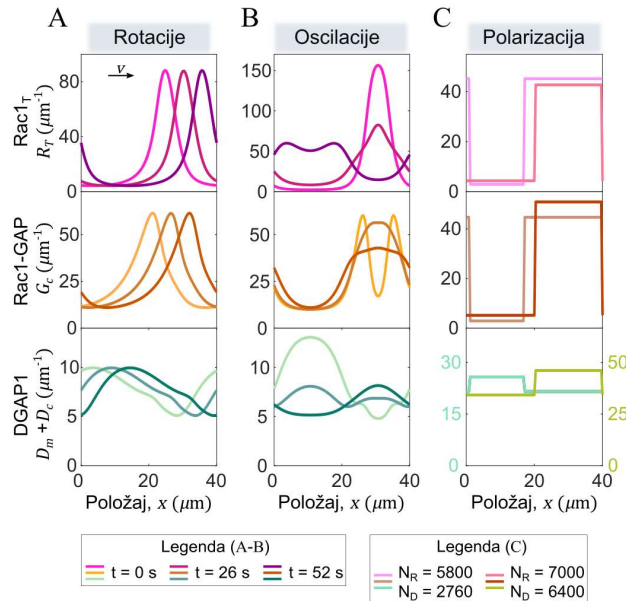
Kako bismo istražili karakteristike Rac1-DGAP1 modela, numerički smo riješili jednadžbe (3.6.1)-(3.6.7) za biološki relevantne parametre (Tablica 5). Otkrili smo da nakon prijelaznog razdoblja sustav postiže ili dinamički režim (putujući ili stojni valovi) ili stacionarni režim (Slika 3-16).

U slučaju putujućih valova, sve distribucije proteina vezanih na membranu okarakterizirane su izraženim vrhovima, koji putuju istom konstantnom brzinom (Slika 3-16A). Profili Rac1 i kompleksa Rac1-GAP tvore slične obrasce s time da Rac1-GAP malo zaostaje za Rac1 (kao što je slučaj s  $u_2$  i  $w$  u modelu III). Nasuprot tome, Rac1 i DGAP1 su gotovo antikorelirani, pri čemu se minimum Rac1 pojavljuje blizu maksimuma DGAP1 i obrnuto.

U slučaju stojnih valova, Rac1 i DGAP1 ponovno su antikorelirani, dok odnos Rac1 i Rac1-GAP očekivano nalikuje odnosu koncentracija  $u_2$  i  $w$  u modelu III (Slika 3-16B). Tipično, pojavu vrha gustoće Rac1 prati lokalni minimum okružen s dva maksimuma u distribuciji kompleksa Rac1-GAP. Nestanak vrha Rac1 je pak popraćen stvaranjem novog vrha na poziciji pomaknutoj za  $L/2$ , što odgovara suprotnoj strani stanice.

Za razliku od modela III, gdje smo mogli naići i na šiljaste i na plato stacionarne raspodjele, u ovom smo modelu pronašli samo plato obrasce s karakterističnim oštro odvojenim

domenama. U slučaju Rac1 i Rac1-GAP kompleksa postoji velika razlika u koncentraciji proteina između dviju domena, dok je kod DGAP1 ta razlika mnogo manja (Slika 3-16C). Zanimljivo, distribucije Rac1 i DGAP1 mogu biti korelirane ili antikorelirane, ovisno o ukupnom broju DGAP1 molekula. U oba slučaja, Rac1 i Rac1-GAP kolokaliziraju.

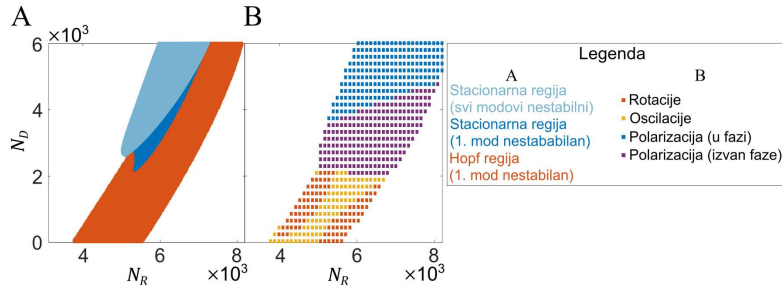


Slika 3-16. **Obrasci u simulacijama.** U slučaju putujućih i stojnih valova, dijagrami pokazuju molekularne koncentracije u ovisnosti o položaju na membrani za tri točke u vremenu. U slučaju polarnih stanja, prikazane su koncentracije za različite brojeve kopija molekula Rac1 i DGAP1. (A) Valovi koji putuju u desno konstantnom brzinom  $v$ . Smjer kretanja vala ovisi samo o početnim uvjetima. Rac1 i DGAP1 su negativno korelirani.  $N_R = 4500$ ,  $N_D = 800$ . (B) Stojni valovi (oscilacije). Rac1 i DGAP1 ponovno su negativno korelirani.  $N_R = 5000$ ,  $N_D = 800$ . (C) Polarno stanje. Za manje  $N_R$  i  $N_D$  Rac1 i DGAP1 su negativno korelirani, a za veće vrijednosti  $N_R$  i  $N_D$  su pozitivno korelirani. Vrijednosti ostalih parametara navedene su u tablici 5.

Kako bismo sustavno istražili parametarski prostor, proveli smo linearnu analizu stabilnosti jednadžbi (3.6.1)-(3.6.7). Obzirom da je model baziran na modelu III nije nas iznenadila pojava Hopfove nestabilnosti, koja ukazuje na pojavu oscilacija, i stacionarne nestabilnosti, koja ukazuje na prisutnost stacionarnih obrazaca. Međutim, za razliku od analiziranih inačica modela III, ovaj model posjeduje samo jedno ravnotežno stanje, što je posljedica većeg broja jednadžbi, odnosno članova u jednadžbama.

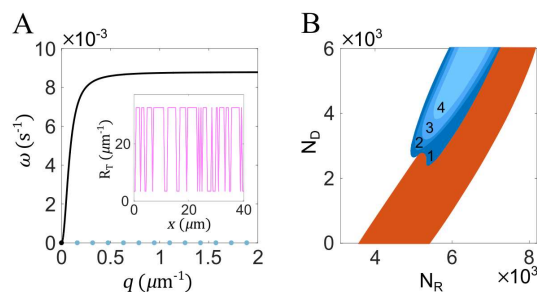
Zanimljivo, prijelaze između oscilatornih i stacionarnih nestabilnosti može izazvati već sama promjena ukupnog broja molekula Rac1 i DGAP1,  $N_R$  i  $N_D$  (Slika 3-17A). Rezultati računalnih simulacija potvrdili su da različite vrijednosti  $N_R$  i  $N_D$  zaista mogu dovesti do različitih ishoda (Slika 3-17B). Osim ukupnog broja molekula, važnu ulogu u ponašanju sustava imaju i difuzije membranskih proteina. Primjerice, ako izjednačimo sve membranske

difuzijske koeficijente s nulom,  $d_{R_T} = d_{G_c} = d_{D_m} = d_{D_c} = 0$ , formiranje stacionarnih obrazaca moguće je samo uz velik broj molekula DGAP1, odnosno za  $N_D > N_D^S \gg 0$ , dok za  $N_D < N_D^S$  sustav formira isključivo oscilatorne obrasce. Najveći utjecaj na visinu praga  $N_D^S$  ima vrijednost konstante  $d_{G_c}$  (difuzija kompleksa Rac1-GAP u membrani). Već za vrijednost  $d_{G_c} \sim 0.6 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  prag  $N_D^S$  spušta se na nulu. Dakle, kada nema proteina DGAP1, odnosno ciklusa (ii), sustav može formirati stacionarne obrasce ako dopustimo proteinima da difundiraju po membrani.



Slika 3-17. **Obrasci u ovisnosti o ukupnom broju molekula Rac1 i DGAP1.** (A) Stabilna, stacionarna i Hopf regija u  $N_R$  -  $N_D$  ravnini (dobiveno linearnom analizom stabilnosti). Stacionarna regija nalazi se iznad  $N_D^S \sim 2000$ . U bezbojnim područjima male perturbacije ravnotežnih stanja trnu s vremenom. Dijagram je konstruiran za duljinu membrane  $L = 40 \mu\text{m}$ , čime je skup valnih brojeva ograničen na modove  $q = 2n\pi/L$ . Vrijednosti ostalih parametara navedene su u tablici 5. (B) Dijagram ovisnosti konačnog obrasca o  $N_R$  i  $N_D$ , dobiven promatranjem rezultata simulacija. Ponovno svjedočimo nepotpunom slaganju između rezultata linearne analize stabilnosti i rezultata simulacija. Npr. za veće  $N_R$  i  $N_D$  (desno gore), linearna analiza stabilnosti predviđa formiranje oscilatornih obrazaca, no sustav ipak formira polarna stanja.

Difuzija po membrani utječe na broj i dugovječnost polova u multipolarnim stanjima. Kada nema difuzije po membrani, u jednom dijelu  $N_R$  -  $N_D$  ravnine koji pripada stacionarnoj regiji svi su Fourierovi modovi nestabilni (Slika 3-17A). Sličan rezultat pojavio se u modelu II, no tada je brza difuzija  $d_1$  komponente  $U_1$  bila dovoljna da konačno stanje ipak bude monopolarno. U ovom slučaju konačni obrazac može biti multipolarni unatoč difuzijama u citoplazmi (Slika 3-18A), te je za dobivanje monopolarnog stanja nužno dopustiti barem jednoj membranskoj komponenti da difundira (Slika 3-18B) (citoplazmatska difuzija nije dovoljna zbog toga što sve citoplazmatske koncentracije vrlo brzo poprimaju homogenu raspodjelu). Napomenimo još da za niske vrijednosti membranskih difuzija, vrijeme fuzioniranja polova može biti iznimno dugo. Primjerice, za  $d_{R_T} = 0.01 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  dva pola mogu koegzistirati dulje od  $10^{15}$  s, pa za takvo stanje možemo reći da je kvazistabilno.

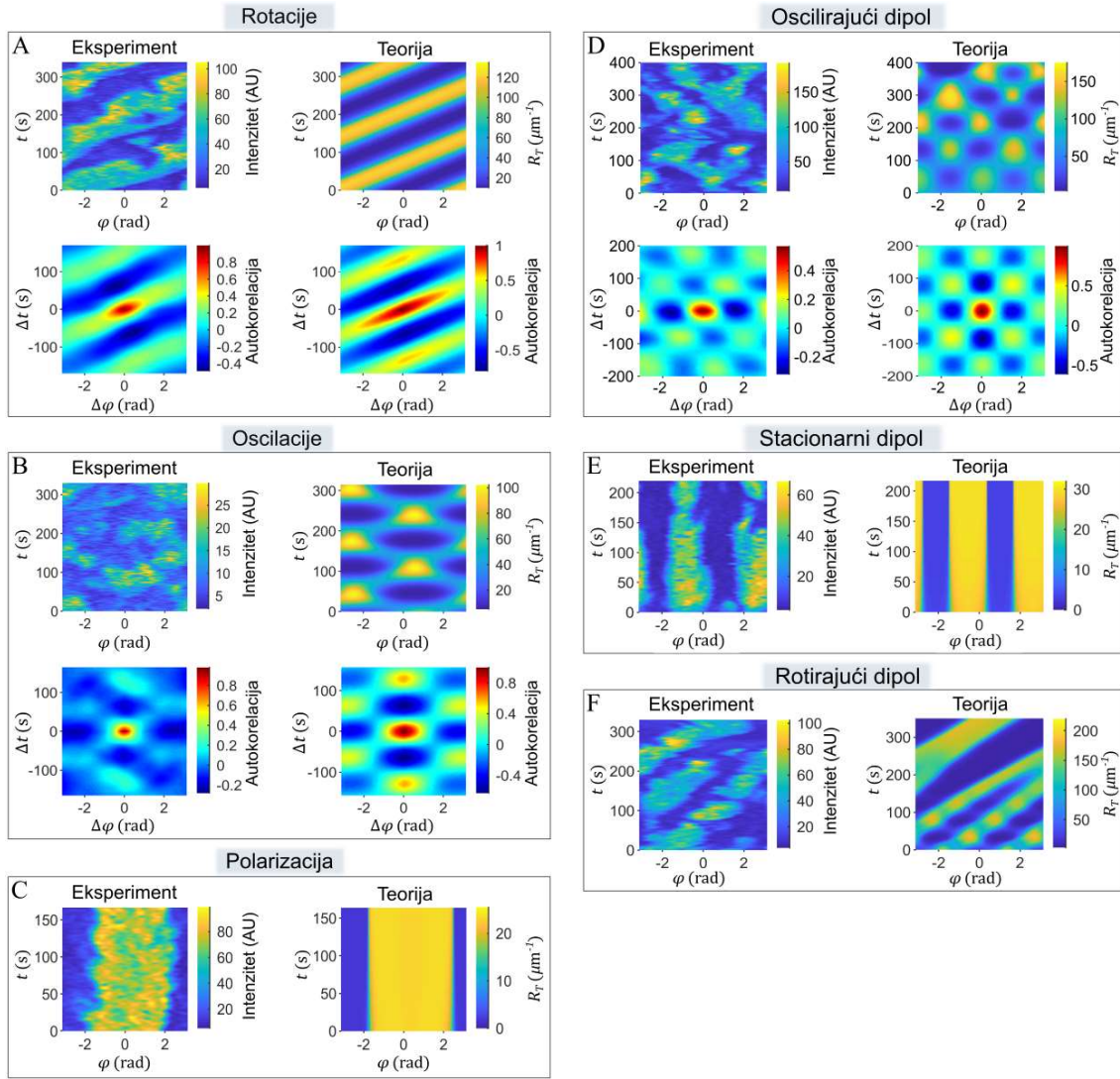


Slika 3-18. **Utjecaj membranskih difuzija na polarna stanja.** (A) Disperzijska relacija (krivulja rasta) dobivena linearnom analizom stabilnosti za vrijednosti parametara iz tablice 5 (osim  $N_R/L = 175$ ,  $N_G/L = 30$ ,  $N_D/L = 160$ ). Svi Fourier modovi su nestabilni (označeni plavim točkama). *Sredina* Rezultat simulacije je multipolarni obrazac. Početni uvjeti postavljeni su u ravnotežne vrijednosti na koje je dodan bijeli Gauss-ov šum (snr = 30 dB, gdje snr predstavlja omjer signal-šum). (B) Prisutnost membranske difuzije snizila je broj nestabilnih modova u dijelu stacionarnog područja gdje su prethodno svi modovi bili nestabilni. Za  $d_{R_T} = 0.05 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ , samo su prva četiri moda nestabilna. Dakle, difuzija na membrani utječe na broj membranskih domena na kojima može doći do velikog porasta koncentracija, ali i uzrokuje stapanje tih domena u jednu stabilnu domenu.

### 3.7 Prostorno-vremenska raspodjela aktivnosti Rac1: usporedba eksperimenata i rezultata modela

Kako bismo usporedili eksperimentalno i teorijski dobivene obrasce, suprotstavili smo kimografe izmjerenog signala sonde za aktivni Rac1, DPAKa(GBD)-DYFP, u membrani i linearne koncentracije Rac1-GTP izračunate modelom (Slika 3-19). Za obrasce koji predstavljaju rotaciju, te oscilacije prvog i drugog reda, također smo konstruirali autokorelograme kako bismo olakšali njihovo prepoznavanje (Slika 3-19A, B, D). Model reproducira glavne karakteristike eksperimentalno promatranih obrazaca aktivnosti Rac1, uključujući periode i valne profile. Među stacionarnim obrascima, najčešća su monopolarna stanja (Slika 3-19C), no zabilježili smo i nekoliko slučajeva bipolarnih obrazaca u trajanju od nekoliko minuta (Slika 3-19E). Uz tipične osnovne obrasce, model je također reproducirao fine detalje dinamike Rac1-GTP. Na primjer, uspješno smo simulirali spajanje dviju rotirajućih domena obogaćenih Rac1-GTP-om u jednu domenu koja nastavlja putovati istom brzinom (Slika 3-19F).

Osim prijelaza između pravilnih i nasumičnih obrazaca, također smo snimili nekoliko slučajeva prijelaza između različitih pravilnih obrazaca, kao što je prijelaz iz oscilacija u rotacije (Slika 3-20A), te iz rotacija u smjeru kazaljke na satu u rotacije suprotnog smjera (Slika 3-20B). Uz navedene prijelaze, uspješno smo simulirali i prijelaze iz polarnih stanja u rotacije, te iz rotacija u oscilacije.



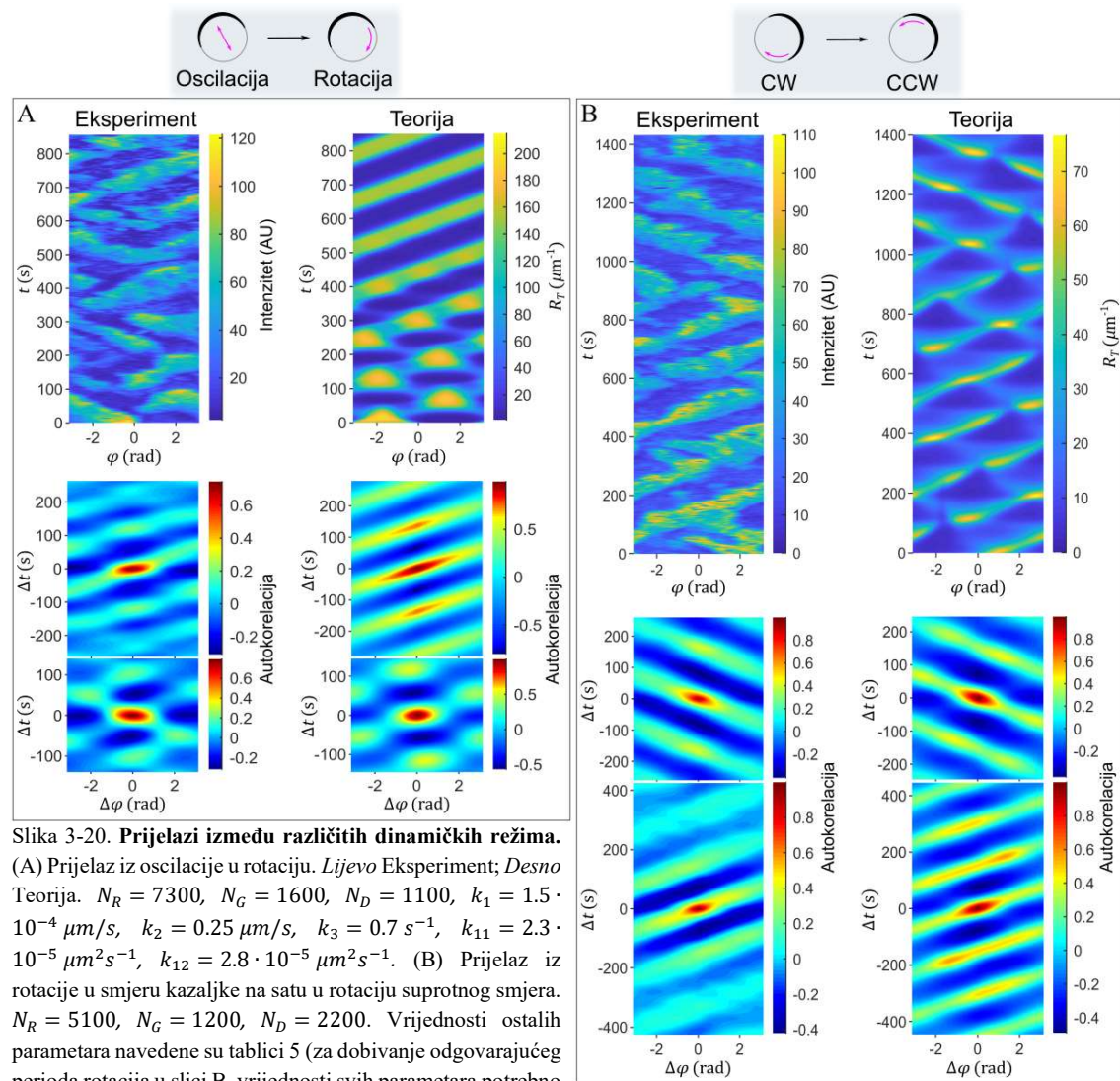
Slika 3-19. Usporedba između eksperimentalno opaženih uzoraka DPAKa(GBD)-DYFP sonde i uzoraka Rac1-GTP dobivenih računalnim simulacijama. Na panelima A, B, i D obrasci su prikazani u obliku kimografa (Matlab karta boja: parula) i odgovarajućih autokorelograma (Matlab karta boja: jet). Na ostalim panelima prikazani su samo kimografi. Eksperimentalni kimografi prikazuju intenzitet fluorescencije izmjeren uzduž opsega stanice (kutni položaj  $\varphi$ ) u odnosu na vrijeme ( $t$ ). U simuliranim kimografima prikazane su linearne koncentracije Rac1-GTP,  $R_T$ . Autokorelogrami predstavljaju produkt odgovarajuće normaliziranih kimografa sa svojom kopijom pomaknutom u vremenu ( $\Delta t$ ) i prostoru ( $\Delta \varphi$ ). Prikazani obrasci odgovaraju sljedećim tipovima dinamike: (A) Rotirajući monopol,  $N_R = 7000$ ,  $N_G = 1000$ ,  $N_D = 900$ ,  $k_3 = 0.77 \text{ s}^{-1}$ ; (B) Oscilirajući monopol,  $N_R = 6000$ ,  $N_G = 1200$ ,  $N_D = 900$ ,  $k_3 = 0.65 \text{ s}^{-1}$ ; (C) Stacionarni monopol,  $N_R = 6200$ ,  $N_G = 1200$ ,  $N_D = 3400$ ; (D) oscilirajući dipol,  $N_R = 8600$ ,  $N_G = 2000$ ,  $N_D = 1300$ ,  $L = 60 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $k_3 = 0.42 \text{ s}^{-1}$ ; (E) Stacionarni dipol,  $N_R = 6000$ ,  $N_G = 1100$ ,  $N_D = 4400$ ; (F) Rotirajući dipol,  $N_R = 8000$ ,  $N_G = 1400$ ,  $N_D = 1400$ ,  $L = 60 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $k_1 = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ }\mu\text{m/s}$ ,  $k_2 = 0.33 \text{ }\mu\text{m/s}$ ,  $k_3 = 0.6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{11} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ }\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Vrijednosti ostalih parametara navedene su u tablici 5.

Već smo raspravljali o ulozi membranske difuzije na broj i dugovječnost polova koji se pojavljuju u simulacijama. Sličan efekt na dinamiku polova može se postići variranjem duljine prostornog intervala  $L$ . Množenje duljine  $L$  faktorom  $a$  ekvivalentno je množenju svih

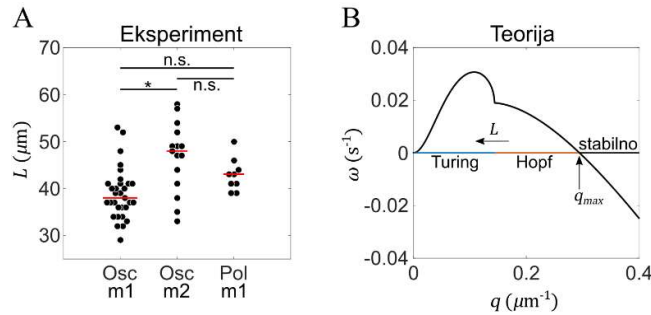


difuzijskih konstanti faktorom  $1/a^2$ . Dakle, povećanje prostorne domene produljuje trajanje višepolarnih stanja, jednako kao i snižavanje vrijednosti difuzijskih konstanti.

Za razliku od promjena difuzijskih koeficijenata, varijacije u duljini membrane mogu se izmjeriti relativno lako, i korelirati s varijacijama u ponašanju sustava. Analiza stanica u kojima smo pronašli oscilatorne obrasce sugerira da u manjim stanicama dominiraju obrasci prvog reda, dok se obrasci drugog reda pojavljuju uglavnom u većim stanicama (Slika 3-21A). Ovi su rezultati u skladu s predikcijama linearne analize stabilnosti. Naime, za tipične krivulje rasta  $\text{Re } \omega$  poprima pozitivne vrijednosti na intervalu  $(0, q_{\max})$ , a budući da su duljina membrane i valni broj povezani preko relacije  $q = 2n\pi/L$ , vrijednost  $q_{\max}$  određuje minimalnu duljinu,  $L_n^{\min} = 2n\pi/q_{\max}$ , na kojoj će mod reda  $n$  postati nestabilan. Za vrijednosti parametara iz tablice 5 dobivamo  $L_1^{\min} \sim 20 \mu\text{m}$ ,  $L_2^{\min} \sim 40 \mu\text{m}$ , itd.



Zanimljivo, korištene vrijednosti parametara (Tablica 5) pripadaju Turing-Hopf regiji, u kojoj neki rastući modovi imaju realne, a neki kompleksne stope rasta (Slika 3-21B). Za manje  $L$  (veće  $q$ ) stope rasta su kompleksne, a za veće  $L$  (manje  $q$ ) stope rasta poprimaju realne vrijednosti, što sugerira da za manje  $L$  sustav formira oscilatorna, a za veće  $L$  može formirati i polarna stanja. Međutim, simulacije pokazuju da je konačno stanje uvijek oscilatorno, neovisno o vrijednosti  $L$ . Dakle, predikcija modela jest da pojava polarnih obrazaca u stanicama ne korelira s povećanjem opsega, odnosno povećanjem veličine stanice. Zaista, analizom eksperimentalnih podataka pokazali smo da nema značajne razlike u veličini stanica koje formiraju oscilatorne, u odnosu na veličinu stanica koje formiraju polarne obrasce (Slika 3-21A).



Slika 3-21. **Utjecaj veličine stanice na oscilatorne i stacionarne obrasce.** (A) Usporedba izmjerenih opsega stanica u kojima Rac1 proteini formiraju oscilatorne obrasce prvog reda (Osc m1), oscilatorne obrasce drugog reda (Osc m2) i stacionarne obrasce prvog reda (Pol m1). Crvene linije označavaju srednje vrijednosti:  $L(\text{osc\_m1}) = 38$  ( $36 - 41$ )  $\mu\text{m}$ ,  $n = 31$ ;  $L(\text{osc\_m2}) = 48$  ( $42 - 51$ )  $\mu\text{m}$ ,  $n = 15$ ;  $L(\text{Pol\_m1}) = 43$  ( $40 - 45$ )  $\mu\text{m}$ ,  $n = 9$ , (medijan, interkvartilni raspon); \*  $P < 0.01$ , n.s., nije signifikantno. Statistička analiza provedena je pomoću Kruskal-Wallisovog testa (Matlab funkcija `kruskalwallis`). Za usporedbu parova dodatno je korišten Tukey-Kramerov test. (B) Brzina rasta ima pozitivne vrijednosti za valne brojeve unutar intervala  $(0, q_{\text{max}})$ . Vrsta nestabilnosti mijenja se iz oscilatorne (Hopf) u stacionarnu (Turing) s povećanjem  $L$  (smanjenjem  $q$ ), što je obilježeno prijelomom na krivulji rasta. Međutim, za sve  $L > L_1^{\text{min}}$ , simulacije rezultiraju s oscilatornim obrascem. Vrijednosti parametara navedene su u tablici 5.

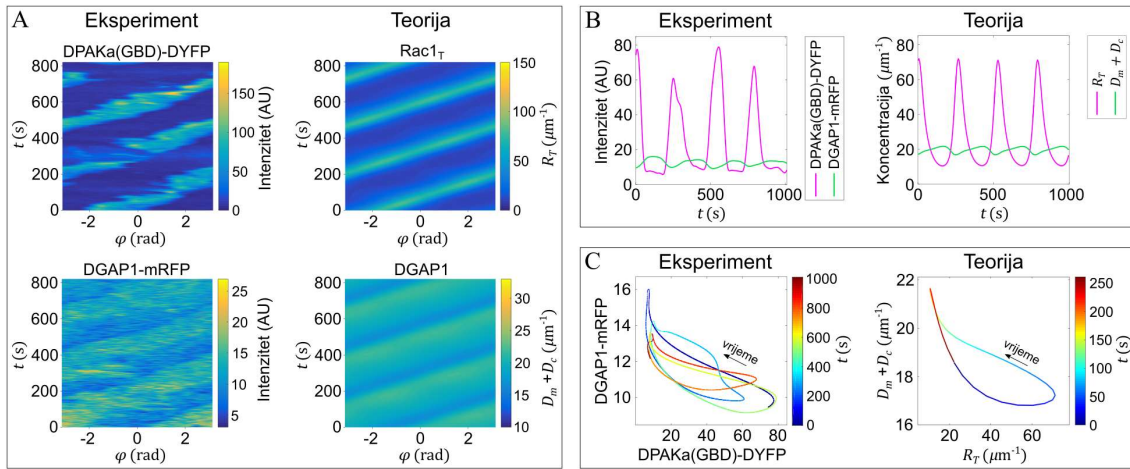
### 3.8 Fazni odnos između aktivnog Rac1 i DGAP1

Budući da i sonda DPAKa(GBD)-DYFP i DGAP1 stupaju u interakciju s aktivnim Rac1, prilično je kontraintuitivno pronaći odgovarajuće fluorescentne signale lokalizirane na suprotnim stranama stanice. Kako bismo ovu značajku uključili u naš model, uveli smo negativnu regulaciju DGAP1, u kojoj je molekula DGAP1 prisiljena napustiti membranu nakon interakcije s aktivnim Rac1. Doista, ovakav tip interakcije dovodi do pretežno negativno koreliranih distribucija Rac1 i DGAP1 u oscilatornim obrascima (Slika 3-22A).



Kako bismo kvantificirali i detaljnije analizirali odnos između aktivnog Rac1 i DGAP1 tijekom rotacija, usporedili smo odgovarajuće vremenske serije intenziteta fluorescencije izmjerene u jednoj točki na membrani. Međutim, analiziranje fluorescencije iz jedne prostorne točke pokazalo se nepraktičnim zbog previše šuma. Stoga smo odlučili izraditi prosječnu vremensku seriju koristeći podatke sakupljene iz svih prostornih točaka. Budući da između pojedinačnih vremenskih serija postoji određeni fazni pomak, morali smo ih prvo međusobno 'poravnati'. U tu svrhu koristili smo metodu koja se naziva analiza glavnih komponenti (vidi 2.2). Nakon što smo konstruirali tipične vremenske profile signala DPAKa(GBD)-DYFP i DGAP1-mRFP, usporedili smo ih sa simulacijom modela (Slika 3-22B). Karakteristike simuliranih valova, kao što su periodičnost, oblik profila, relativni intenziteti, te fazni odnos između valova Rac1 i DGAP1, odlično se podudaraju s eksperimentalnim podacima.

Koristeći iste skupove podataka, prikazali smo evoluciju intenziteta fluorescencije obiju sonde u faznoj ravlini. Rac1 i DGAP1 signali ocrtavaju fazni portret karakterističnog oblika polumjeseca, u kojem se evolucija odvija u smjeru suprotnom od kazaljke na satu (Slika 3-22C). Fazni portret dobiven iz simulacija ima vrlo sličan oblik. Zanimljivo, da bismo u simulacijama reproducirali točan smjer evolucije sustava (suprotan od smjera kazaljke na satu), morali smo uvesti kooperativno vezanje DGAP1 na membranu, što je u jednadžbama modela opisano pomoću članova koji sadrže konstante  $k_{41}$  i  $k_{42}$ . Bez ovih članova, evolucija sustava uvijek se odvijala u smjeru kazaljke na satu, bez obzira na izbor vrijednosti parametara.



Slika 3-22. **Odnosi putujućih valova Rac1 i DGAP1.** (A) *Lijevo* Kimografi koji prikazuju rotacijske obrasce DPAKa(GBD)-DYFP i DGAP1-mRFP sonde. *Desno* Kimografi koji prikazuju rotacijske obrasce Rac1-GTP i DGAP1 dobivene računalnom simulacijom. (B) *Lijevo* Prosječni intenziteti fluorescencije DPAKa(GBD)-DYFP i DGAP1-mRFP, dobiveni analizom glavnih komponenti putujućih valova, prikazani kao funkcije vremena. *Desno* Vremenske serije koncentracija Rac1-GTP i DGAP1 u jednoj prostornoj točki dobivene računalnim simulacijama. (C) Fazni portreti konstruirani korištenjem podatkovnih točaka iz (B). Fazni portret dobiven iz simuliranih podataka prikazuje jedan period rotacije (granični ciklus). Vrijeme je kodirano bojom.  $N_R = 5400$ ,  $N_G = 1400$ ,  $N_D = 1500$ ,  $k_3 = 0.39 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{11} = 1.5 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $k_{12} = 2.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $k_{41} = 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $k_{42} = 5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Vrijednosti ostalih parametara navedene su tablici 5.

### 3.9 Simetropija i usporedba eksperimenata s rezultatima stohastičkog modela

U prethodnim smo poglavljima usporedili rezultate računalnih simulacija Rac1-DGAP1 modela srednjeg polja s podacima iz eksperimenata. Model je vrlo uspješno reproducirao dinamiku proteina Rac1, ali i karakteristični odnos između Rac1 i DGAP1. No, kao što smo već spomenuli u potpoglavljima 3.1 i 3.2, većina stanica većinu vremena provodi u 'nasumičnom' kretanju, dok se obrasci polarizacije, stojnih i putujućih valova pojavljuju relativno rijetko. Da bismo razjasnili kako i zašto stanice dijele svoje vrijeme na razdoblja uređenog i razdoblja nasumičnog kretanja, konstruirali smo stohastičku verziju reakcijsko-difuzijskog modela. Osim toga, razvili smo posebnu metodu za kvantifikaciju pravilnosti obrazaca koja se bazira na konceptu simetropije (poglavlje 2.3).

U svrhu računanja simetropije najprije smo nasumičnim odabirom izdvojili  $N = 50$  stanica iz skupa koji objedinjuje podatke iz 85 stanica koje eksprimiraju samo sondu za aktivni Rac1 i podatke iz 93 stanice koje eksprimiraju obje fluorescentne sonde. Za svaku snimljenu stanicu obrazac fluorescencije vizualno je predstavljen u obliku kimografa, odnosno matematički u formi matrice intenziteta. Umjesto računanja simetropije za cijeli obrazac, uvođenjem 'prozora opservacije', računamo simetropiju na dijelovima obrasca, te stvaramo vektor simetropije  $S_M^c$ , za stanicu  $c$ . Dakle, prozor opservacije jest kvadratna poddomena kroz koju promatramo dio obrasca, odnosno dio matrice intenziteta veličine  $M \times M$ . Veličinu prozora opservacije postavili smo na  $32 \times 32$  piksela što odgovara fizičkim dimenzijama  $\sim 100 \text{ s} \times l$ , gdje je  $l = L/2$ . Ovu smo veličinu odabrali jer je dovoljno velika da obuhvati svojstva simetrija uobičajenih obrazaca, a ujedno dovoljno mala da rezultira velikom količinom podataka.

Prelaskom prozora po svim mogućim položajima dobivamo

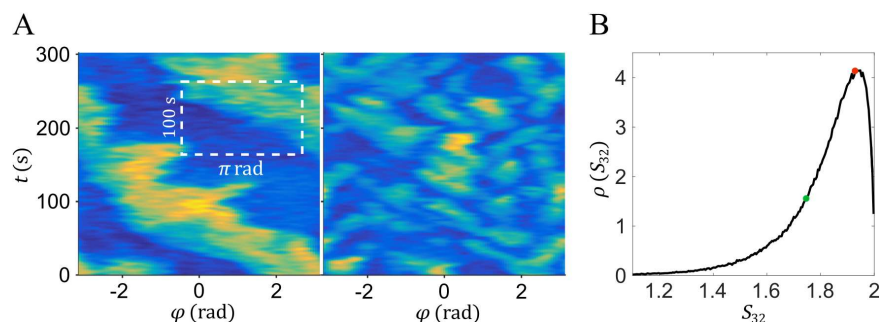
$$S_{32}^c = (S_{32}^{c,1}, S_{32}^{c,2}, \dots, S_{32}^{c,e}, \dots, S_{32}^{c,K_c}),$$

gdje simbol  $S_{32}^{c,e}$  predstavlja simetropiju dijela obrasca koji pripada stanici  $c$ , promatranog kroz  $e$ -ti prozor veličine  $32 \times 32$ ;  $K_c$  je ukupan broj mogućih položaja prozora. Za stanice u kojima se pojavljuju obrasci visokog stupnja pravilnosti, vrijednost  $S_{32}^c$  bit će relativno niska, dok u stanicama s nepravilnim obrascima možemo očekivati relativno visoke vrijednosti  $S_{32}^c$  (Slika 3-233A). Spajanjem vektora simetropije za svih  $N$  stanica, dobivamo

$$S_{32} = (S_{32}^1, \dots, S_{32}^{50}) = (S_{32}^{1,1}, \dots, S_{32}^{1,K_1}, \dots, S_{32}^{50,1}, \dots, S_{32}^{50,K_{50}}),$$

iz čega računamo funkciju gustoće vjerojatnosti simetropije,  $\rho(S_{32})$ , pridružene  $32 \times 32$  obrascu (Slika 3-233B). Maksimalnu vrijednost  $\rho(S_{32})$  postiže za  $S_{32} = 1.94$ , odnosno za

vrijednost simetropije koju nalazimo kod nepravilnih obrazaca. Dakle, rezultati analize simetropije u skladu su s očekivanjima - nepravilni obrasci pojavljuju se češće od pravilnih.

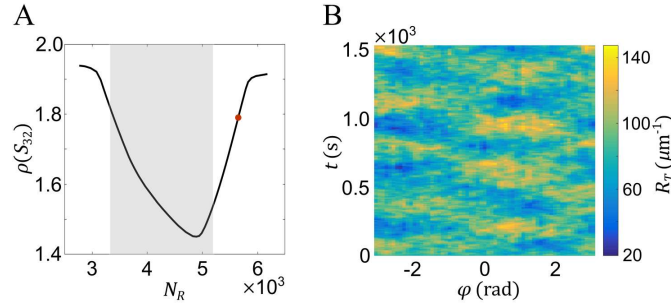


Slika 3-233. **Simetropija obrazaca DPAKa(GBD)-DYFP.** (A) *Lijevo* Primjer uredenog obrasca, s niskom prosječnom simetropijom,  $\langle S_{32} \rangle = 1.75$ . *Desno* Primjer neuredenog obrasca, s visokom prosječnom simetropijom,  $\langle S_{32} \rangle = 1.93$ . Bijeli iscrtkani pravokutnik predstavlja pomični prozor veličine  $32 \times 32$  piksela ( $100 \text{ s} \times \pi \text{ rad}$ ). Simetropija je izračunata za sve položaje prozora i zatim usrednjena. (B) Graf gustoće vjerojatnosti. Zelena točka označava vrijednost gustoće vjerojatnosti za simetropiju  $S = 1.75$ , a crvena točka označava vrijednost gustoće vjerojatnosti za  $S = 1.93$ .

Analizu simetropije sada primjenjujemo na obrascima dobivenim iz simulacija stohastičkog modela. Zanima nas kako se vrijednost simetropije, odnosno pravilnost obrasca mijenja s položajem u parametarskom prostoru. Za stohastički model odabrali smo samo one reakcije koje opisuju interakcije proteina Rac1 s proteinom GAP. Svaka dodatna reakcija značajno produljuje trajanje simulacija, a s obzirom da nam ovdje nije cilj vjerno reproducirati odnose između Rac1 i DGAP1, već istražiti generalni utjecaj stohastičkih fluktuacija na svojstva obrazaca u različitim položajima u parametarskom prostoru, odlučili smo iz modela izostaviti protein DGAP1.

Simulacije stohastičkog modela proveli smo na intervalu vrijednosti  $N_R \in (2800, 6200)$ , koji je veći od intervala na kojem simulacije modela srednjeg polja rezultiraju pravilnim obrascima ( $N_R \in (3300, 5200)$ ) - izvan tog intervala sustav poprima homogena ravnotežna rješenja). Za svaki obrazac koji je generirala stohastička simulacija izračunali smo prosječnu vrijednost simetropije  $\langle S_{32} \rangle$ , te konstruirali graf ovisnosti  $\langle S_{32} \rangle$  o  $N_R$  (Slika 3-A). Za mali broj molekula,  $N_R < 3000$ , simetropija poprima visoke vrijednosti,  $\langle S_{32} \rangle > 1.9$ , koje odgovaraju neuređenim obrascima. Porastom broja molekula simetropija počinje opadati a u odgovarajućim obrascima pojavljuju se naznake oscilacija i rotacija. Ulaskom u područje u kojem deterministički model generira obrasce, vrijednost simetropije i dalje opada te u neposrednoj blizini  $N_{max}$  poprima najniže vrijednosti. Daljnjim povećanjem broja molekula i izlaskom iz tog područja, iako u porastu, simetropija je i dalje relativno niska; još kod

$N_R \sim 5600$  dolazi do stvaranja uređenih obrazaca (Slika 3-B). Dakle, stohastičke fluktuacije proširuju područje parametarskog prostora unutar kojeg je moguća formacija obrazaca.

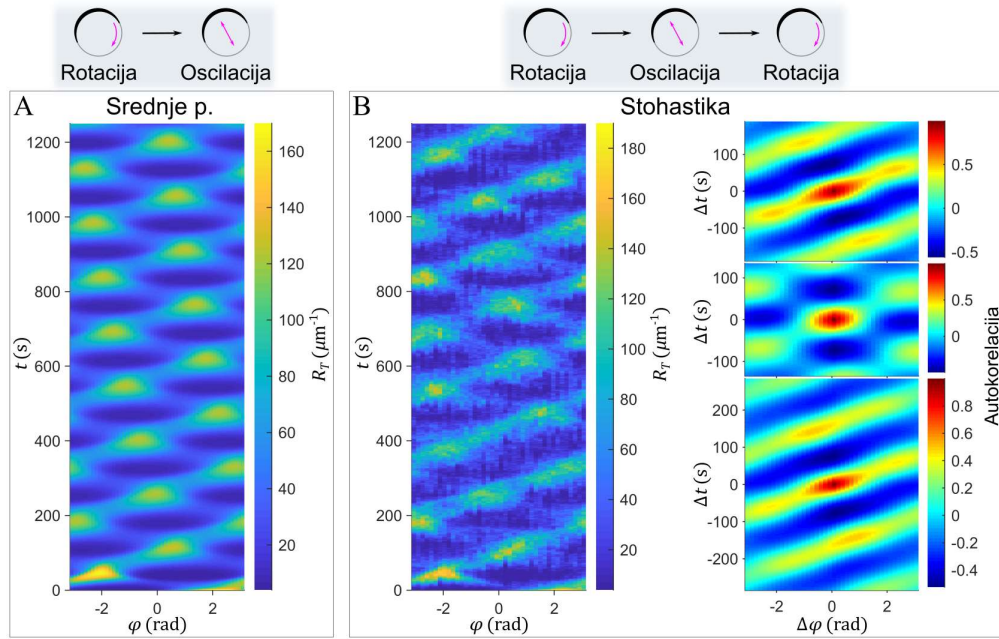


Slika 3-24. **Simetropija i obrasci u stohastičkim simulacijama.** (A) Ovisnost simetropije o ukupnom broju Rac1 molekula. Sivom bojom označen je interval vrijednosti  $N_R$  unutar kojeg model srednjeg polja generira obrasce. (B) Simulacija stohastičkog modela u  $N_R = 5600$ , s početnim uvjetima postavljenim u ravnotežno stanje. Dok bi u modelu srednjeg polja sustav zauvijek ostao u ravnotežnom stanju, u stohastičkom modelu dolazi do formiranja obrasca (putujućeg vala), s prosječnom vrijednošću simetropije  $\langle S_{32} \rangle = 1.79$  (crvena točka na slici A). Vrijednosti parametara su:  $R_T^{max} = 220 \mu m^{-1}$ ,  $d_{R_D} = 50 \mu m^2 s^{-1}$ ,  $d_G = 25 \mu m^2 s^{-1}$ ,  $k_1 = 5 \cdot 10^{-5} \mu m/s$ ,  $k_2 = 0.25 \mu m/s$ ,  $k_3 = 0.25 s^{-1}$ ,  $k_{11} = 2.1 \cdot 10^{-5} \mu m^2 s^{-1}$ ,  $k_{12} = 2.5 \cdot 10^{-5} \mu m^2 s^{-1}$ ,  $L = 40 \mu m$ .

Usporedbom ovih rezultata s analizom simetropije na eksperimentalno dobivenim obrascima, prepoznavamo dva suprotstavljena čimbenika koji utječu na razinu pravilnosti obrazaca u stanicama. Prvi čimbenik jest položaj u parametarskom prostoru. Naime, analiza eksperimentalnih podataka pokazala nam je da se neuređeni obrasci pojavljuju s najvećom vjerojatnošću, iz čega zaključujemo da stanice većinu vremena obitavaju u području parametarskog prostora u kojem simulacije modela srednjeg polja rezultiraju stanjima s prostorno homogenim raspodjelama proteina. Drugi čimbenik su stohastičke fluktuacije, koje spriječavaju potpunu relaksaciju u ravnotežno stanje, te pospješuju pojavu obrazaca kraćeg vijeka trajanja i na područjima gdje ne očekujemo nastanak obrasca. Dakle, niska razina uređenosti obrazaca u stanicama koje se slobodno kreću uzrokovana je specifičnim vrijednostima parametara, kojima je izbjegnuto područje parametarskog prostora u kojem bi stanice bile zarobljene u striktno definiranom modu ponašanja. S druge strane, stohastičke fluktuacije, pomalo paradoksalno, pomažu u nastanku obrazaca. Ovakvo balansiranje između nasumičnih i pravilnih obrazaca, odnosno između nasumičnog i pravilnog kretanja, predstavlja optimalnu strategiju pretraživanja podloge po kojoj se stanice kreću (Li, Nørrelykke and Cox, 2008).

Nasumične fluktuacije također omogućuju promjenu moda ponašanja čak i kada su parametri takvi da sustav teži formirati jasno definirani obrazac. Fluktuacije mogu razmazati

granice između dijelova parametarskog prostora, pa je tako moguće opaziti reverzibilne prijelaze između oscilatornog i stacionarnog moda ili primjerice između oscilacija i rotacija (Slika 3-25). S druge strane, prijelazi do kojih dolazi u modelu srednjeg polja odvijaju se uvijek u jednom smjeru.



Slika 3-25. **Prijelazi između različitih dinamičkih režima u stohastičkom modelu su reverzibilni.** (A) Model srednjeg polja - prijelaz iz putujućeg u stoji val. Prijelazi nisu reverzibilni. (B) Stohastički model. *Lijevo.* Sustav započinje s putujućim valom, nakon čega dolazi do pojave oscilacija, odnosno stoji vala, koji se pri kraju simulacije ponovno pretvara u putujući val. (*Desno*) Odgovarajući autokorelogram. Vrijednosti parametara su:  $R_T^{max} = 220 \mu\text{m}^{-1}$ ,  $d_{R_D} = 45 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $d_G = 20 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $k_1 = 5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}/\text{s}$ ,  $k_2 = 0.5 \mu\text{m}/\text{s}$ ,  $k_3 = 0.45 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{11} = 1.7 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $k_{12} = 2.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $L = 40 \mu\text{m}$ .

### 3.10 Vrijednosti parametara Rac1-DGAP1 modela

Na kraju ćemo pojasniti odabir vrijednosti parametara korištenih u numeričkim simulacijama modela Rac1-DGAP1. Izmjerali smo da je prosječna duljina membrane snimljenih stanica približno jednaka  $40 \mu\text{m}$ . Molekularna masa malih GTPaza iz obitelji Rho tipično varira između 20 i 25 kDa (Mondal, Hsiao and Goueli, 2015), masa proteina DGAP1 iznosi 95 kDa (Faix *et al.*, 1998), a masa RhoGAP proteina iz *D. discoideum*, DRG, iznosi 150 kDa (Knetsch *et al.*, 2001). Na temelju vrijednosti difuzijskog koeficijenta molekule GFP (27 kDa) izmjerene u citoplazmi stanica *D. discoideum* ( $27 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) (Bretschnider *et al.*, 2002), vrijednost difuzijskog koeficijenta za Rac1 postavljena je na  $d_R = 30 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Einstein-Stokesova jednačba predviđa da bi difuzijski koeficijent sferičnog proteina trebao biti inverzno

proporcionalan s molekularnom masom ( $d \sim M^{-1/3}$ ). Međutim, ako protein nije globularan, njegov efektivni radijus postaje veći, a vrijednost difuzijskog koeficijenta postaje manja od one koja je predviđena Einstein-Stokesovom jednažbom. Nadalje, proteini u citoplazmi mogu sudjelovati u nespecifičnim interakcijama koje smanjuju njihovu mobilnost. Na primjer, velika razlika između izmjerenih i predviđenih vrijednosti difuzijskih koeficijenata opažena je u gusto napučenoj citoplazmi stanica *E. coli* (Kumar, Mommer and Sourjik, 2010). Utvrđeno je da se manji proteini ponašaju u skladu s relacijom  $d \sim M^{-2}$ , dok za veće proteine ( $M > 100$  kDa) difuzijski koeficijent može postati gotovo neovisan o  $M$ . Shodno navedenim činjenicama, postavili smo inicijalne vrijednosti difuzijskih koeficijenata proteina DGAP1 i GAP na  $d_D = 12 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  i  $d_G = 8 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Vrijednosti membranskih difuzija varirali smo između 0 i  $1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . U stanicama MCF-7 izmjereni su difuzijski koeficijenti dviju različitih populacija Rac1 na membrani: slobodne, brzo difundirajuće populacije,  $\sim 0.4 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ , te populacije Rac1 molekula koje su vezane u kompleks s nekom drugom molekulom,  $\sim 0.02 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  (Das *et al.*, 2015).

Da bismo procijenili ukupan broj molekula pojedine vrste proteina, transformirali smo dostupne informacije o 3D koncentracijama u 1D koncentracije. Budući da molekule imaju više slobode za kretanje u  $xy$ -ravnini, odnosno stanice obično leže priljubljene uz površinu, opažena dinamika proteina je donekle neovisna o  $z$ -položaju unutar stanice. Dakle, slobodni smo odabrali tanki horizontalni odsječak koji će predstavljati cijelu stanicu. Odabir debljine odsječka donekle je proizvoljan, no ima direktan utjecaj na količine proteina koje koristimo u simulacijama. Prema uobičajenoj praksi (Jilkin, Marée and Edelstein-Keshet, 2007), debljinu odsječka namjestili smo na 100 nm. Koncentraciju Rac1 u stanici postavili smo na  $1 \mu\text{M}$  (Michaelson *et al.*, 2001), te koristeći tipični polumjer od  $6 \mu\text{m}$ , izračunali da je ukupan broj Rac1 molekula u jednom odsječku približno jednak 7000. Za potrebe simulacija nismo značajno modificirali ovu vrijednost, iako je u našem modelu prostorna domena oblika prstena, a ne diska. Što se tiče ukupnog broja molekula DGAP1 i GAP proteina, koristili smo skaliranje prema njihovim masama, vodeći se pretpostavkom da je brojnost pojedine vrste proteina obrnuto proporcionalna s njegovom masom (Milo, 2013).

Rac1 disocijacijske konstante,  $k_3$ ,  $k_{6a}$ , i  $k_{6b}$  inicijalno su postavljene na  $0.5 \text{ s}^{-1}$ , prema vrijednostima iz literature (Das *et al.*, 2015), te su blago modificirane tijekom simulacija. Da bismo izbjegli prekomjerno nakupljanje proteina vezanih na membranu, uveli smo biološki prihvatljive gornje granice koncentracija vezivnih mjesta za Rac1-GTP ( $R_T^{max}$ ) i DGAP1 ( $D_m^{max}$ ). Nadalje, konstanta vezanja Rac1 molekula na membranu,  $k_1$ , postavljena je tako da

tok Rac1 iz citoplazme na membranu odgovara tipičnim vrijednostima iz literature ( $R_T^{max} \cdot k_1 \sim 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), (Tang *et al.*, 2018). Na sličan su način odabrane vrijednosti konstanti  $k_{11}$  i  $k_{12}$ , kao i inicijalne vrijednosti konstanti vezanja DGAP1 molekula,  $k_4$ ,  $k_{41}$ , i  $k_{42}$ . Konačno, konstante vezanja Rac1-GTP na GAP ( $k_2$ ), te na DGAP1 ( $k_5$ ) odabrane su tako da pripadajući tokovi u ravnotežnom stanju odgovaraju redu veličine od  $1 \text{ s}^{-1}$  (Marée *et al.*, 2006).

Inicijalne numeričke vrijednosti svih parametara izlistane su u tablici 5. Na njima smo bazirali pretragu parametarskog prostora, te ih prilagođavali ne bismo li reproducirali sva opažena dinamička svojstva sustava, kao što su profili valova, periodi, te odnosi između Rac1 i DGAP1 signala.

Tablica 5. Vrijednosti parametara.

| Parametar   |                                                                     | Vrijednost                                   |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| $R_T^{max}$ | Koncentracija zasićenja membranskog Rac1                            | $200 \mu\text{m}^{-1}$                       |
| $D_m^{max}$ | Koncentracija zasićenja membranskog DGAP1                           | $40 \mu\text{m}^{-1}$                        |
| $d_{RD}$    | Difuzijska konstanta za Rac1 u citoplazmi                           | $30 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$              |
| $d_{RT}$    | Difuzijska konstanta za Rac1 na membrani                            | $0 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$               |
| $d_G$       | Difuzijska konstanta za GAP u citoplazmi                            | $8 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$               |
| $d_{Gc}$    | Difuzijska konstanta za Rac1-GAP kompleks na membrani               | $0 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$               |
| $d_D$       | Difuzijska konstanta za DGAP1 u citoplazmi                          | $12 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$              |
| $d_{Dm}$    | Difuzijska konstanta za DGAP1 na membrani                           | $0 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$               |
| $d_{Dc}$    | Difuzijska konstanta za Rac1-DGAP1 kompleks na membrani             | $0 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$               |
| $k_1$       | Pričvrščivanje na membranu i aktivacija Rac1                        | $10^{-4} \mu\text{m}/\text{s}$               |
| $k_2$       | Stvaranje kompleksa Rac1-GAP                                        | $0.22 \mu\text{m}/\text{s}$                  |
| $k_3$       | Disocijacija kompleksa Rac1-GAP                                     | $0.45 \text{ s}^{-1}$                        |
| $k_{11}$    | Pričvrščivanje na membranu i aktivacija Rac1 stimulirani s Rac1-GTP | $2 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ |
| $k_{12}$    | Pričvrščivanje na membranu i aktivacija Rac1 stimulirani s Rac1-GAP | $3 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ |
| $k_5$       | Stvaranje kompleksa Rac1-DGAP1                                      | $0.095 \mu\text{m}/\text{s}$                 |
| $k_{6a}$    | Disocijacija kompleksa Rac1-DGAP1 (Rac1 ostaje na membrani)         | $0.6 \text{ s}^{-1}$                         |
| $k_{6b}$    | Disocijacija kompleksa Rac1-DGAP1 (Rac1 odlazi u citoplazmu)        | $0.43 \text{ s}^{-1}$                        |
| $k_4$       | Pričvrščivanje DGAP1 na membranu                                    | $0.006 \mu\text{m}/\text{s}$                 |
| $k_{41}$    | Pričvrščivanje DGAP1 na membranu stimulirano s Rac1-GTP             | $2 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ |
| $k_{42}$    | Pričvrščivanje DGAP1 na membranu stimulirano s Rac1-GAP             | $9 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ |
| $L$         | Opseg stanice                                                       | $40 \mu\text{m}$                             |
| $N_R$       | Ukupan broj Rac1 molekula                                           | 5200                                         |
| $N_G$       | Ukupan broj GAP molekula                                            | 1200                                         |
| $N_D$       | Ukupan broj DGAP1 molekula                                          | 1600                                         |

## 4 DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Unutarstanične oscilacije malih GTPaza iz obitelji Rho opažene su u nizu eukariotskih organizama (Wu and Lew, 2013). Nakupine aktivnog Cdc42 osciliraju s karakterističnim periodom od 4-5 minuta u stanicama pupajućih kvasaca (Howell *et al.*, 2012). Tijekom bipolarnog rasta fizijskih kvasaca aktivni Cdc42 fluktuiraju između polova s prosječnim periodom od 5 minuta (Das *et al.*, 2012). U biljkama, koncentracija aktivne GTPaze Rop1 oscilira na vrhovima rastućih peludnih cjevčica s periodom u rasponu između 1 i 3 minute (Hwang *et al.*, 2005). Tijekom stvaranja kontakta s ciljnim stanicama, u ljudskim NK stanicama aktivnost proteina Cdc42 oscilira s periodičnošću od 5 do 6 minuta (Carlin *et al.*, 2011). Aktivne Rho GTPaze se tijekom razvoja embrija žabe *Xenopus* nakupljaju na korteksu u valovima koji putuju površinom s karakterističnim periodom od 1 do 3 minute (Bement *et al.*, 2015). Zanimljivo je da su periodičnosti svih ovih oscilacija u rasponu od nekoliko minuta, što ukazuje na to da slični mehanizmi reguliraju dinamiku Rho GTPaza u različitim organizmima. Na ovaj popis dodajemo Rac1, koji u *D. discoideum* pokazuje oscilatornu dinamiku s periodom u tipičnom rasponu od 2 do 5 minuta.

Rac proteini, zajedno s drugim GTPazama iz obitelji Rho, orkestriraju izgradnju supramolekularnih aktinskih struktura u pokretnim stanicama (Jaffe and Hall, 2005). Nizom neovisnih metoda pokazano je da RacA u stanicama sisavaca, te srodni Rac1 u stanicama *D. discoideum*, potiču formiranje lamelipodija i pseudopodija (Hodgson, Pertz and Hahn, 2008; Filić *et al.*, 2012; Marinović *et al.*, 2016). Međutim, manje je poznato da Rac također sudjeluje u regulaciji neprotruzivnih i kontraktilnih regija aktinskog korteksa (Gardiner *et al.*, 2002; Filić *et al.*, 2014; Bolado-Carrancio *et al.*, 2020). Rac1 tako obavlja različite funkcije na prednjem i stražnjem kraju stanica *D. discoideum* kroz selektivne interakcije s različitim nizvodnim efektorima. Relativno malo eksperimentalnog rada posvećeno je detaljnijem ispitivanju ove dvojake uloge Rho GTPaza. U ovom radu pratili smo dinamiku jednog efektoru Rac1, proteina DGAP1, koji sudjeluje u ispreplitanju aktinskih filamenata tipičnom za stražnje i lateralne kortikalne regije, te smo korelirali njegovu dinamiku s aktivnošću Rac1. Važno je spomenuti da se rezultati simulacija našeg računalnog modela slažu s pomalo kontraintuitivnim eksperimentalnim opažanjima koja pokazuju da su maksimumi koncentracija aktivnog Rac1 i njegovog efektoru DGAP1 pretežno negativno korelirani (Filić *et al.*, 2012, 2014). Također, značajno je da se ovaj rezultat pojavljuje u modelu koji ne uzima eksplicitno u obzir interakciju aktivnog Rac1 s drugim, kompetirajućim efektorima. Model, međutim, uključuje pozitivnu kooperativnost u aktivaciji, odnosno vezivanju Rac1 na membranu, čiji temeljni mehanizam



vjerojatno uključuje interakciju Rac1 s njegovim efektorima. Nadalje, pojava periodičnih obrazaca Rac1 u simulacijama neovisna je o prisutnosti DGAP1, čime je opovrgnuta prethodna hipoteza koja je predlagala da bi uklanjanje, odnosno sekvestriranje Rac1 putem vezanja na DGAP1 moglo biti ključno za pojavu opaženih oscilacija (Filić *et al.*, 2014).

Razvoj teorijskog modela dinamike Rac1 započeli smo razmatranjem jednostavnih općenitih dvokomponentnih i trokomponentnih modela. Za potonji smo pokazali da predstavlja minimalni model sposoban za formiranje stacionarnih obrazaca. Modifikacije ovog modela koje uključuju uvođenje četvrte komponente i reakcije stvaranja kompleksa dviju komponenti pokazale su se nužnim kako bi model, uz stacionarne, generirao i oscilatorne obrasce. Zanimljiva karakteristika stacionarnih obrazaca u spomenutim modelima jest istovremena pojava šiljastih i plato raspodjela, koje se dosad smatralo značajkama modela različitih tipova (Chiou *et al.*, 2018). Pojava šiljastih raspodjela vezala se uz modele u kojima se javljaju Turingove bifurkacije (Otsuji *et al.*, 2007; Goryachev and Pokhilko, 2008), dok se plato obrasci vežu uz tzv. bistabilne "wave pinning" modele (Ozbudak, Becskei and van Oudenaarden, 2005; Beta, Amselem and Bodenschatz, 2008; Mori, Jilkine and Edelstein-Keshet, 2008). Također, Turingove, odnosno šiljaste obrasce, povezivalo se s kompeticijom između različitih polova u multipolarnim stanjima. Nasuprot tome, plato obrasce smatra se metastabilnim, u kojima do fuzioniranja različitih domena dolazi iznimno sporo u odnosu na vrijeme fuzioniranja vrhova u Turingovim obrascima. Ponuđena su različita objašnjenja zašto dolazi do fuzioniranja susjednih domena. Neki autori smatraju da razlozi leže u strukturi reakcijske mreže i mehanizmima povratne sprege, a neki pak tvrde da je to posljedica specifičnih vrijednosti parametara, kao što je ukupna koncentracija proteina, katalitička aktivnost, veličina stanice i slično (Otsuji *et al.*, 2007; Jilkine and Edelstein-Keshet, 2011; Howell *et al.*, 2012). Također, nedavno je predloženo da se stabilnost multipolarnih distribucija određuje stupnjem zasićenja, odnosno time koliko je maksimum koncentracije u polarnoj domeni blizu "točki zasićenja", koja je određena parametrima modela (Chiou *et al.*, 2018; Chiou, Moran and Lew, 2021). Kada je vrh daleko od točke zasićenja, lako dolazi do fuzioniranja polova, no kad koncentracija dosegne maksimalnu moguću vrijednost, vrh se krene širiti i nastane plato koji može postojati jako dugo prije nego se spoji sa susjednom domenom. Rezultati naših modela ukazuju na nešto kompleksniji mehanizam regulacije polarnih stanja. Uz maksimalnu koncentraciju plato obrasca, koja inverzno korelira s karakterističnim vremenom fuzioniranja polova, značajnu ulogu ima i zasićenje u obliku maksimalnog broja vezivnih mjesta na membrani, čija vrijednost pak pozitivno korelira s vremenom fuzioniranja susjednih domena. Također, treba istaknuti i ključni utjecaj difuzije na stapanje domena, koja diktira broj tranzijentnih polova i utječe na

karakteristično vrijeme fuzioniranja. Specifično, u Rac1-DGAP1 modelu, difuzija po membrani omogućila je spajanje susjednih domena i formiranje konačnog monopolarnog stanja. Takav rezultat ne iznenađuje, obzirom da je za spajanje domena nužna komunikacija kroz prostor, odnosno izmjena mase kroz prostor, koju u reakcijsko-difuzijskim jednadžbama omogućuju jedino difuzijski članovi, a ne prostorno lokalni reakcijski članovi.

Naš konačni model opisuje: 1) prostorno-vremenske distribucije aktivnog Rac1 i DGAP1, u režimima rotacija, oscilacija, i polarnih stanja; 2) prijelaze između različitih promatranih dinamičkih režima; i 3) relativne intenzitete i fazne odnose između aktivnih Rac1 i DGAP1 signala na membrani. Model se sastoji od 7 komponenti: 3 monomerna proteina (2 od njih u dvije različite konformacije, u citosolu i na membrani) i dva heterodimerna kompleksa na membrani. Nelinearni članovi u modelu opisuju kooperativno vezanje Rac1-GDP i DGAP1 na membranu posredovano Rac1-GTP proteinom, samim ( $k_{11}$  i  $k_{41}$ ) ili u kompleksu s GAP proteinom ( $k_{12}$  i  $k_{41}$ ). Uvođenje ovih članova uglavnom je motivirano sličnim mehanizmima uspostavljenim u drugim organizmima, ali i uvjetom da se svojstva oscilatornih obrazaca, te fazni odnos između Rac1-GTP i DGAP1 u stojnim i putujućim valovima usklade s eksperimentalnim rezultatima.

U *D. discoideum* do sada su pronađena i klasificirana 54 različita RhoGEF proteina, od kojih je za neke dokazana aktivnost prema Rac1 (Rivero and Xiong, 2016; Forbes *et al.*, 2022). Za proteine DRG (Knetsch *et al.*, 2001), DockA i DockD (Para *et al.*, 2009) i Rac GEF1 (Park *et al.*, 2004) pokazalo se da se brzo translociraju u korteks stanica nakon globalne stimulacije cAMP-om, istodobno translokaciji i aktivaciji Rac1 u korteksu. Stoga je moguće da nekoliko različitih Rac GEF proteina sudjeluje u aktivaciji Rac1 na membrani stanica *D. discoideum*. Također, pokazalo se da RacGEF1 posreduje u petlji pozitivne povratne sprege između F-aktina i aktivnosti Rac1 (Miao *et al.*, 2019), čime se opravdava središnji mehanizam pozitivne povratne sprege implicitno postuliran u našem modelu i opisan nelinearnim reakcijskim članom koji sadrži konstantu  $k_{11}$ .

Tri proteina *D. discoideum* kombiniraju domene RhoGEF i RhoGAP u istoj molekuli (Rivero and Xiong, 2016). Samo je DdRacGAP1 (DRG, XacA) detaljno okarakteriziran; pokazalo se da ima neobičnu strukturu, s N-terminalnim RhoGAP-SH3 parom i dvije C-terminalne DH domene odvojene PH domenom. U *in vitro* eksperimentima potvrđena je GEF aktivnost C-terminalne regije, ali i GAP aktivnost N-terminalne regije DRG-a prema Rac1A (Ludbrook, Eccleston and Strom, 1997; Knetsch *et al.*, 2001). Zbog ovakve dvostruke funkcije DRG proteina valjano je pretpostaviti da kompleks Rac1-DRG ima pozitivan utjecaj na

regrutiranje molekula Rac1 iz citoplazme. U našem modelu ovaj je proces opisan nelinearnim reakcijskim članom koji sadrži konstantu  $k_{12}$ .

U modelu smo pretpostavili da se GAP protein specifičan za Rac1 regrutira u stanični korteks direktnim vezanjem za Rac1-GTP. Sličan mehanizam vezanja već su predlagali i drugi autori (Khalili *et al.*, 2020). Od 46 proteina koji nose RhoGAP domenu u organizmu *D. discoideum*, samo je nekoliko njih detaljno opisano (Rivero and Xiong, 2016; Forbes *et al.*, 2022), a budući da ti proteini sudjeluju u nekoliko signalnih putova, specifičnost njihove GAP aktivnosti prema određenim Rho GTPazama nije bila u fokusu objavljenih studija. Pokazalo se da je Dd5P4 protein, koji sadrži RhoGAP domenu, uglavnom lokaliziran u citoplazmi, te se njegova translokacija na nabore membrane odvija tek nakon aktivacije Rac-a (Faucherre *et al.*, 2005; Loovers *et al.*, 2007). Slično, CARMIL-GAP veže Rac1A i ubrzava njegovu stopu hidrolize GTP-a, ali njegova je lokalizacija uglavnom citoplazmatska i djelomično se podudara s kortikalnim F-aktinom u fagocitozi i kemotaksiji (Jung *et al.*, 2022). Iz ovih podataka slijedi da je lokalizacija karakteriziranih RhoGAP-ova iz *D. discoideum* uglavnom citosolna i da se oni samo prolazno regrutiraju na membranu interakcijom s aktivnim Rac1. Podaci iz stanica sisavaca također sugeriraju da regrutacija GAP-ova na membranu ovisi o Rac-u (Amin *et al.*, 2016). U našem modelu ovaj je proces opisan reakcijskim članom koji sadrži konstantu  $k_2$ .

U modelu pretpostavljamo da se, za razliku od RhoGAP-a, DGAP1 prvo veže na membranu, a zatim stupa u interakciju s aktiviranim Rac1. DGAP1 se translocira na membranu čak i u stanicama u kojima je polimerizacija aktina poremećena primjenom latrunculina A, i u kojima se Rac1 odvaja od membrane. Dakle, regrutiranje DGAP1 na membranu može se odvijati neovisno o Rac1 (Filić *et al.*, 2012). DGAP1 također pokazuje uglavnom kortikalnu lokalizaciju u netretiranim vegetativnim stanicama i obogaćen je u kortikalnim regijama gdje je koncentracija Rac1 relativno niska. Nadalje, studije IQGAP proteina sisavaca ukazuju na njihovu interakciju s membranskim fosfolipidima (Dixon *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2021). U našem Rac1-DGAP1 modelu ovaj je proces opisan reakcijskim članom koji sadrži konstantu  $k_4$ .

Dva načelno neovisna procesa, inaktivacija Rac1 pomoću GAP-a i njegova ekstrakcija iz membrane pomoću proteina GDI, u našem su modelu spojena u jedan korak, pod pretpostavkom da inaktivacija pomoću GAP-a uvijek prethodi disocijaciji s membrane (Garcia-Mata, Boulter and Burridge, 2011; Golding *et al.*, 2019). U model smo uključili i alternativni proces deaktivacije i otpuštanja Rac1 u citosol, potpomognut molekulom DGAP1 (član s konstantom  $k_{6b}$ ). Naime, već je pokazano da protein IQGAP1 (srodan proteinu DGAP1) igra

negativnu ulogu u regulaciji aktivnosti Rac1 (Peng *et al.*, 2021). U invazivnim pseudopodijima fosforilacija Rac1-specifičnog GAP proteina, RacGAP1, rezultira njegovim regrutiranjem u kompleks koji uključuje IQGAP1, gdje inhibira aktivnost Rac1 (Jacquemet, Green, *et al.*, 2013). Također, u stanicama raka jajnika, receptor ET-1 promovira interakciju kompleksa  $\beta$ -arrestin1/IQGAP1 s RacGAP1 kako bi se suzbila aktivnost Rac1 (Chellini *et al.*, 2019).

Uz navedeni proces inaktivacije i razgradnje kompleksa Rac1-GTP/DGAP1 koja rezultira otpuštanjem njegovih komponenti u citosol, uveli smo još jedan put razgradnje u kojem Rac1-GTP ostaje vezan za membranu (član s konstantom  $k_{6a}$ ). Iako postoje dokazi da GDI mogu ekstrahirati i neaktivne i aktivne GTPaze *in vitro* i *in vivo* (Golding *et al.*, 2019), komplementarni dokazi iz biokemijskih i bioloških studija sugeriraju da su aktivne GTPaze manje stabilno vezane za GDI u usporedbi s njihovim neaktivnim oblikom (Slaughter *et al.*, 2009; Garcia-Mata, Boulter and BurrIDGE, 2011; Hodgson *et al.*, 2016). Ova sekundarna ekstrakcijska grana zapravo može predstavljati petlju kroz koju se aktivni Rac1 ne samo uklanja sa staničnih membrana, već se i brzo na njih vraća (Golding *et al.*, 2019).

Zaključno, naši eksperimentalni rezultati pružaju dodatne dokaze da su aktivnosti malih Rho GTPaza sklone autonomnim, konstitutivnim prostorno-vremenskim oscilacijama u eukariotskim stanicama. Naši rezultati modeliranja potkrepljuju ideju da regulacija signalne aktivnosti Rho GTPaza pomoću proteina GEF i GAP može dovesti do oscilatorne dinamike. Bilo bi zanimljivo istražiti kako neki drugi efektori osim DGAP1 utječu na dinamiku Rac1. Također, mogao bi se istražiti i utjecaj mehaničkih sila izazvanih polimerizacijom aktina i deformacijama membrane na biokemijske signalne reakcije. Općenito, funkcionalni značaj oscilacija Rho GTPaza još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Rezultati različitih studija sugeriraju da oscilacije igraju važnu ulogu u kretanju stanica, odnosno u optimizaciji procesa pretraživanja podloge po kojoj se kreću (Karsenti, 2008; Das *et al.*, 2012; Beta and Kruse, 2017). S druge strane, moguće je da su one ponekad jednostavno nusprodukt topologije mreže interakcija proteina (Kruse *et al.*, 2005; Wu and Lew, 2013). U slučaju vegetativnih stanica *D. discoideum*, oscilacije Rac1 mogle bi omogućiti stanicama da se brže prilagođavaju lokalnom okruženju u kojem se uvjeti brzo mijenjaju preusmjeravajući aktivnosti aktinskog citoskeleta. Obzirom da karakteristike oscilatornog ponašanja ovise o topologiji unutarstaničnih signalnih putova, oscilacije mogu pomoći u razumijevanju interakcija između njihovih komponenti (Yang and Wu, 2018). Međutim, naše istraživanje modela čije reakcije slijede zakon o djelovanju masa, pokazalo je da već kod vrlo jednostavnih trokomponentnih modela postoji više različitih konfiguracija mreže reakcija koje dovode do formiranja stacionarnih obrazaca s gotovo identičnim karakteristikama. Slično, kod četverokomponentnog modela smo pronašli

različite kombinacije reakcija koje mogu dovesti do formiranja stacionarnih i oscilatornih obrazaca. Ovakva redundantnost objašnjava raširenu pojavu obrazaca u različitim tipovima stanica, ali također ističe važnost praćenja što je moguće većeg broja potencijalnih interaktora, ili provedbe komplementarnih eksperimenata koji bi pomogli pri odabiru ispravnog modela. Naši rezultati modeliranja pokazuju da način vezanja interakcijskih partnera Rac1 na membranu ima presudan utjecaj na karakteristike dinamike simuliranog sustava.

Osim modela srednjeg polja, analiza stohastičke verzije modela potvrđuje prethodne ideje da je pojava tranzijentnih obrazaca posljedica specifičnih parametarskih vrijednosti, koje se nalaze izvan područja unutar kojeg bi sustav bio zarobljen u jednom obrascu ponašanja, što bi pak imalo negativne efekte na sposobnost promjenjivog kretanja stanica (Altschuler *et al.*, 2008; Hecht, Kessler and Levine, 2010).

## 5 POPIS LITERATURE

- Altschuler, S.J. *et al.* (2008) ‘On the spontaneous emergence of cell polarity’, *Nature*, 454(7206), pp. 886–889. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07119>.
- Amin, E. *et al.* (2016) ‘Deciphering the Molecular and Functional Basis of RHOGAP Family Proteins: A SYSTEMATIC APPROACH TOWARD SELECTIVE INACTIVATION OF RHO FAMILY PROTEINS’, *The Journal of Biological Chemistry*, 291(39), pp. 20353–20371. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736967>.
- Atkins, B.D., Yoshida, S. and Pellman, D. (2008) ‘Symmetry Breaking: Scaffold Plays Matchmaker for Polarity Signaling Proteins’, *Current Biology*, 18(24), pp. R1130–R1132. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.005>.
- Bastos, R.N. *et al.* (2012) ‘CYK4 inhibits Rac1-dependent PAK1 and ARHGEF7 effector pathways during cytokinesis’, *Journal of Cell Biology*, 198(5), pp. 865–880. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201204107>.
- Bement, W.M. *et al.* (2015) ‘Activator-inhibitor coupling between Rho signalling and actin assembly makes the cell cortex an excitable medium’, *Nature Cell Biology*, 17(11), pp. 1471–1483. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb3251>.
- Beta, C., Amselem, G. and Bodenschatz, E. (2008) ‘A bistable mechanism for directional sensing’, *New Journal of Physics*, 10(8), p. 083015. Available at: <https://doi.org/10.1088/1367-2630/10/8/083015>.
- Beta, C. and Kruse, K. (2017) ‘Intracellular Oscillations and Waves’, *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 8(1), pp. 239–264. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-conmatphys-031016-025210>.
- Blagg, S.L. *et al.* (2003) ‘PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in Dictyostelium’, *Current biology: CB*, 13(17), pp. 1480–1487. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00580-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00580-3).
- Bolado-Carrancio, A. *et al.* (2020) ‘Periodic propagating waves coordinate RhoGTPase network dynamics at the leading and trailing edges during cell migration’, *eLife*. Edited by A. Mogilner, A.M. Walczak, and L. Edelstein-Keshet, 9, p. e58165. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.58165>.
- Bos, J.L., Rehmann, H. and Wittinghofer, A. (2007) ‘GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins’, *Cell*, 129(5), pp. 865–877. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>.
- Bressloff, P.C. (2010) ‘Metastable states and quasicycles in a stochastic Wilson-Cowan model of neuronal population dynamics’, *Physical Review E*, 82(5), p. 051903. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.82.051903>.
- Bretschneider, T. *et al.* (2002) ‘Dynamic organization of the actin system in the motile cells of Dictyostelium’, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(7–8), pp. 639–649. Available at: <https://doi.org/10.1023/a:1024455023518>.

- Brown, M.D. and Sacks, D.B. (2006) 'IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP', *Trends in Cell Biology*, 16(5), pp. 242–249. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.03.002>.
- Burianek, L.E. and Soderling, S.H. (2013) 'Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24(4), pp. 258–266. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.12.005>.
- Butty, A.-C. *et al.* (2002) 'A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization', *The EMBO Journal*, 21(7), pp. 1565–1576. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1565>.
- Carlin, L.M. *et al.* (2011) 'A targeted siRNA screen identifies regulators of Cdc42 activity at the natural killer cell immunological synapse', *Science Signaling*, 4(201), p. ra81. Available at: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001729>.
- Chan, C., Beltzner, C.C. and Pollard, T.D. (2009) 'Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments', *Current biology: CB*, 19(7), pp. 537–545. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.060>.
- Chang, F. and Minc, N. (2014) 'Electrochemical control of cell and tissue polarity', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, pp. 317–336. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013357>.
- Charras, G. and Paluch, E. (2008) 'Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(9), pp. 730–736. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2453>.
- Chellini, L. *et al.* (2019) 'Regulation of extracellular matrix degradation and metastatic spread by IQGAP1 through endothelin-1 receptor signalling in ovarian cancer', *Matrix Biology*, 81, pp. 17–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.10.005>.
- Chen, Z. *et al.* (2010) 'Structure and Control of the Actin Regulatory WAVE Complex', *Nature*, 468(7323), pp. 533–538. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature09623>.
- Chiou, J., Moran, K.D. and Lew, D.J. (2021) 'How cells determine the number of polarity sites', *eLife*. Edited by M.K. Balasubramanian and N. Barkai, 10, p. e58768. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.58768>.
- Chiou, J.-G. *et al.* (2018) 'Principles that govern competition or co-existence in Rho-GTPase driven polarization', *PLOS Computational Biology*, 14(4), p. e1006095. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006095>.
- Chiou, J.-G., Balasubramanian, M.K. and Lew, D.J. (2017) 'Cell Polarity in Yeast', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33, pp. 77–101. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060856>.
- Choi, S. *et al.* (2013) 'IQGAP1 is a novel phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate effector in regulation of directional cell migration', *The EMBO Journal*, 32(19), pp. 2617–2630. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.191>.

- Christiano, R. *et al.* (2014) ‘Global Proteome Turnover Analyses of the Yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*’, *Cell Reports*, 9(5), pp. 1959–1965. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.065>.
- Chung, C.Y. *et al.* (2000) ‘Role of Rac in controlling the actin cytoskeleton and chemotaxis in motile cells’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), pp. 5225–5230. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5225>.
- Chung, C.Y. and Firtel, R.A. (1999) ‘Paka, a Putative Pak Family Member, Is Required for Cytokinesis and the Regulation of the Cytoskeleton in Dictyostelium discoideum Cells during Chemotaxis’, *The Journal of Cell Biology*, 147(3), pp. 559–576.
- Connolly, B.A. *et al.* (2005) ‘Tiam1-IRSp53 complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation’, *Molecular and Cellular Biology*, 25(11), pp. 4602–4614. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.25.11.4602-4614.2005>.
- Cross, M. and Greenside, H. (2009) *Pattern Formation and Dynamics in Nonequilibrium Systems*. Cambridge: Cambridge University Press. Available at: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511627200>.
- Daniels, C.N., Zyla, T.R. and Lew, D.J. (2018) ‘A role for Gic1 and Gic2 in Cdc42 polarization at elevated temperature’, *PLOS ONE*, 13(12), p. e0200863. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200863>.
- Das, M. *et al.* (2012) ‘Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth’, *Science (New York, N.Y.)*, 337(6091), pp. 239–243. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1218377>.
- Das, S. *et al.* (2015) ‘Single-molecule tracking of small GTPase Rac1 uncovers spatial regulation of membrane translocation and mechanism for polarized signaling’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), pp. E267–E276. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1409667112>.
- Dawes, A.T. and Edelstein-Keshet, L. (2007) ‘Phosphoinositides and Rho Proteins Spatially Regulate Actin Polymerization to Initiate and Maintain Directed Movement in a One-Dimensional Model of a Motile Cell’, *Biophysical Journal*, 92(3), pp. 744–768. Available at: <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.090514>.
- DerMardirossian, C. and Bokoch, G.M. (2005) ‘GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation’, *Trends in Cell Biology*, 15(7), pp. 356–363. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.001>.
- Dibner, C., Schibler, U. and Albrecht, U. (2010) ‘The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks’, *Annual Review of Physiology*, 72, pp. 517–549. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>.
- Dixon, M.J. *et al.* (2012) ‘IQGAP proteins reveal an atypical phosphoinositide (aPI) binding domain with a pseudo C2 domain fold’, *The Journal of Biological Chemistry*, 287(27), pp. 22483–22496. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.352773>.



- Donnelly, S.K., Bravo-Cordero, J.J. and Hodgson, L. (2014) 'Rho GTPase isoforms in cell motility: Don't fret, we have FRET', *Cell Adhesion & Migration*, 8(6), pp. 526–534. Available at: <https://doi.org/10.4161/cam.29712>.
- Dormann, D. *et al.* (2002) 'Simultaneous quantification of cell motility and protein-membrane-association using active contours', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 52(4), pp. 221–230. Available at: <https://doi.org/10.1002/cm.10048>.
- Drubin, D.G. and Nelson, W.J. (1996) 'Origins of cell polarity', *Cell*, 84(3), pp. 335–344. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81278-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81278-7).
- Duleh, S.N., Collins, J.T.B. and Pope, R.K. (2005) 'Morphological and functional analysis of Rac1B in Dictyostelium discoideum', *Journal of Electron Microscopy*, 54(6), pp. 519–528. Available at: <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfi070>.
- Dumontier, M. *et al.* (2000) 'Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium', *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 12), pp. 2253–2265. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.113.12.2253>.
- Eden, S. *et al.* (2002) 'Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck', *Nature*, 418(6899), pp. 790–793. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature00859>.
- Eichinger, L. *et al.* (2005) 'The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum', *Nature*, 435(7038), pp. 43–57. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03481>.
- Endo, M., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. (2003) 'The Cdc42 binding and scaffolding activities of the fission yeast adaptor protein Scd2', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2), pp. 843–852. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M209714200>.
- Erban, R., Chapman, J. and Maini, P. (2007) 'A practical guide to stochastic simulations of reaction-diffusion processes'. arXiv. Available at: <https://doi.org/10.48550/arXiv.0704.1908>.
- Erban, R. and Chapman, S.J. (2009) 'Stochastic modelling of reaction-diffusion processes: algorithms for bimolecular reactions', *Physical Biology*, 6(4), p. 046001. Available at: <https://doi.org/10.1088/1478-3975/6/4/046001>.
- Faix, J. *et al.* (1998) 'The IQGAP-related protein DGAP1 interacts with Rac and is involved in the modulation of the F-actin cytoskeleton and control of cell motility', *Journal of Cell Science*, 111 ( Pt 20), pp. 3059–3071. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.111.20.3059>.
- Faix, J. *et al.* (2001) 'Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins', *The EMBO journal*, 20(14), pp. 3705–3715. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3705>.
- Faucherre, A. *et al.* (2005) 'Lowe syndrome protein Ocr11 is translocated to membrane ruffles upon Rac GTPase activation: a new perspective on Lowe syndrome pathophysiology', *Human Molecular Genetics*, 14(11), pp. 1441–1448. Available at: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi153>.

- Filić, V. *et al.* (2012) ‘A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility’, *Journal of Cell Science*, 125(2), pp. 387–398. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.089680>.
- Filić, V. *et al.* (2014) ‘The IQGAP-related protein DGAP1 mediates signaling to the actin cytoskeleton as an effector and a sequestrator of Rac1 GTPases’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), pp. 2775–2785. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1606-3>.
- Filić, V. *et al.* (2021) ‘Regulation of the Actin Cytoskeleton via Rho GTPase Signalling in Dictyostelium and Mammalian Cells: A Parallel Slalom’, *Cells*, 10(7), p. 1592. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10071592>.
- Forbes, G. *et al.* (2022) ‘Interactome and evolutionary conservation of Dictyostelid small GTPases and their direct regulators’, *Small GTPases*, 13(1), pp. 239–254. Available at: <https://doi.org/10.1080/21541248.2021.1984829>.
- Frank, S.R. and Hansen, S.H. (2008) ‘The PIX-GIT complex: a G protein signaling cassette in control of cell shape’, *Seminars in cell & developmental biology*, 19(3), pp. 234–244. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.01.002>.
- Fritz-Laylin, L.K., Lord, S.J. and Mullins, R.D. (2017) ‘WASP and SCAR are evolutionarily conserved in actin-filled pseudopod-based motility’, *The Journal of Cell Biology*, 216(6), pp. 1673–1688. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201701074>.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E. and Burridge, K. (2011) ‘The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs’, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(8), pp. 493–504. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3153>.
- Gardiner, E.M. *et al.* (2002) ‘Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis’, *Current biology: CB*, 12(23), pp. 2029–2034. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01334-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01334-9).
- Geiger, B. *et al.* (2001) ‘Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk’, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(11), pp. 793–805. Available at: <https://doi.org/10.1038/35099066>.
- Gerisch, G. *et al.* (2004) ‘Mobile Actin Clusters and Traveling Waves in Cells Recovering from Actin Depolymerization’, *Biophysical Journal*, 87(5), pp. 3493–3503. Available at: <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047589>.
- Gillespie, D.T. (1977) ‘Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions’, *The Journal of Physical Chemistry*, 81(25), pp. 2340–2361. Available at: <https://doi.org/10.1021/j100540a008>.
- Golding, A.E. *et al.* (2019) ‘Extraction of active RhoGTPases by RhoGDI regulates spatiotemporal patterning of RhoGTPases’, *eLife*, 8, p. e50471. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.50471>.
- Goryachev, A.B. and Pokhilko, A.V. (2008) ‘Dynamics of Cdc42 network embodies a Turing-type mechanism of yeast cell polarity’, *FEBS Letters*, 582(10), pp. 1437–1443. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.03.029>.

- Gotthardt, D. *et al.* (2006) 'Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake', *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 5(12), pp. 2228–2243. Available at: <https://doi.org/10.1074/mcp.M600113-MCP200>.
- Gowrishankar, K. *et al.* (2012) 'Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules', *Cell*, 149(6), pp. 1353–1367. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.008>.
- Graziano, B.R. *et al.* (2017) 'A module for Rac temporal signal integration revealed with optogenetics', *The Journal of Cell Biology*, 216(8), pp. 2515–2531. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201604113>.
- Halatek, J. and Frey, E. (2012) 'Highly Canalized MinD Transfer and MinE Sequestration Explain the Origin of Robust MinCDE-Protein Dynamics', *Cell Reports*, 1(6), pp. 741–752. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.005>.
- Hall, A. (2012) 'Rho family GTPases', *Biochemical Society Transactions*, 40(6), pp. 1378–1382. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST20120103>.
- Han, J.W. *et al.* (2006) 'Role of RacC for the Regulation of WASP and Phosphatidylinositol 3-Kinase during Chemotaxis of Dictyostelium', *The Journal of biological chemistry*, 281(46), pp. 35224–35234. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M605997200>.
- Hart, M.J. *et al.* (1996) 'IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs', *The EMBO journal*, 15(12), pp. 2997–3005.
- Heasman, S.J. and Ridley, A.J. (2008) 'Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(9), pp. 690–701. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2476>.
- Hecht, I., Kessler, D.A. and Levine, H. (2010) 'Transient Localized Patterns in Noise-Driven Reaction-Diffusion Systems', *Physical Review Letters*, 104(15), p. 158301. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.158301>.
- Ho, H.-Y.H. *et al.* (2004) 'Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex', *Cell*, 118(2), pp. 203–216. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.027>.
- Ho, Y.D. *et al.* (1999) 'IQGAP1 integrates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and Cdc42 signaling', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1), pp. 464–470. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.464>.
- Hodgson, L. *et al.* (2016) 'FRET binding antenna reports spatiotemporal dynamics of GDI-Cdc42 GTPase interactions', *Nature Chemical Biology*, 12(10), pp. 802–809. Available at: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2145>.
- Hodgson, L., Pertz, O. and Hahn, K.M. (2008) 'Design and optimization of genetically encoded fluorescent biosensors: GTPase biosensors', *Methods in Cell Biology*, 85, pp. 63–81. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)85004-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85004-2).

- Homblé, F. and Léonetti, M. (2007) 'Emergence of symmetry breaking in fucoid zygotes', *Trends in Plant Science*, 12(6), pp. 253–259. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.007>.
- Howard, J., Grill, S.W. and Bois, J.S. (2011) 'Turing's next steps: the mechanochemical basis of morphogenesis', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(6), pp. 392–398. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3120>.
- Howard, M., Rutenberg, A.D. and de Vet, S. (2001) 'Dynamic compartmentalization of bacteria: accurate division in *E. coli*', *Physical Review Letters*, 87(27 Pt 1), p. 278102. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.278102>.
- Howell, A.S. *et al.* (2012) 'Negative feedback enhances robustness in the yeast polarity establishment circuit', *Cell*, 149(2), pp. 322–333. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.012>.
- Huang, K.C., Meir, Y. and Wingreen, N.S. (2003) 'Dynamic structures in *Escherichia coli*: Spontaneous formation of MinE rings and MinD polar zones', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), pp. 12724–12728. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2135445100>.
- Huxley, H. and Hanson, J. (1954) 'Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation', *Nature*, 173(4412), pp. 973–976. Available at: <https://doi.org/10.1038/173973a0>.
- Huxley, H.E. (1963) 'Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle', *Journal of Molecular Biology*, 7(3), pp. 281–IN30. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80008-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80008-X).
- Hwang, J.-U. *et al.* (2005) 'Oscillatory ROP GTPase Activation Leads the Oscillatory Polarized Growth of Pollen Tubes', *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), pp. 5385–5399. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-05-0409>.
- Inoue, T. and Meyer, T. (2008) 'Synthetic Activation of Endogenous PI3K and Rac Identifies an AND-Gate Switch for Cell Polarization and Migration', *PLOS ONE*, 3(8), p. e3068. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003068>.
- Irazoqui, J.E., Gladfelter, A.S. and Lew, D.J. (2003) 'Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p', *Nature Cell Biology*, 5(12), pp. 1062–1070. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1068>.
- Jacquemet, G., Morgan, M.R., *et al.* (2013) 'Rac1 is deactivated at integrin activation sites through an IQGAP1–filamin-A–RacGAP1 pathway', *Journal of Cell Science*, 126(18), pp. 4121–4135. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.121988>.
- Jacquemet, G., Green, D., *et al.* (2013) '\*RCP-driven  $\alpha 5\beta 1$  recycling suppresses Rac and promotes RhoA activity via the RacGAP1–IQGAP1 complex', *The Journal of cell biology*, 202. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201302041>.
- Jaffe, A.B. and Hall, A. (2005) 'Rho GTPases: biochemistry and biology', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, pp. 247–269. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>.

- Jilkine, A. *et al.* (2011) ‘A Density-Dependent Switch Drives Stochastic Clustering and Polarization of Signaling Molecules’, *PLOS Computational Biology*, 7(11), p. e1002271. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002271>.
- Jilkine, A. and Edelstein-Keshet, L. (2011) ‘A Comparison of Mathematical Models for Polarization of Single Eukaryotic Cells in Response to Guided Cues’, *PLOS Computational Biology*, 7(4), p. e1001121. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001121>.
- Jilkine, A., Marée, A.F.M. and Edelstein-Keshet, L. (2007) ‘Mathematical model for spatial segregation of the Rho-family GTPases based on inhibitory crosstalk’, *Bulletin of Mathematical Biology*, 69(6), pp. 1943–1978. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11538-007-9200-6>.
- Johnson, J.M., Jin, M. and Lew, D.J. (2011) ‘Symmetry breaking and the establishment of cell polarity in budding yeast’, *Current opinion in genetics & development*, 21(6), pp. 740–746. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.09.007>.
- Journet, A. *et al.* (2012) ‘Investigating the macropinocytic proteome of Dictyostelium amoebae by high-resolution mass spectrometry’, *Proteomics*, 12(2), pp. 241–245. Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.201100313>.
- Jung, G. *et al.* (2022) ‘Dual regulation of the actin cytoskeleton by CARMIL-GAP’, *Journal of Cell Science*, 135(12), p. jcs258704. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.258704>.
- Just, W. *et al.* (2001) ‘Spatiotemporal dynamics near a supercritical Turing-Hopf bifurcation in a two-dimensional reaction-diffusion system’, *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 64(2 Pt 2), p. 026219. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.64.026219>.
- Karsenti, E. (2008) ‘Self-organization in cell biology: a brief history’, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(3), pp. 255–262. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2357>.
- Khalili, B. *et al.* (2020) ‘Fission Yeast Polarization: Modeling Cdc42 Oscillations, Symmetry Breaking, and Zones of Activation and Inhibition’, *Cells*, 9(8), p. E1769. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9081769>.
- Kirschner, M., Gerhart, J. and Mitchison, T. (2000) ‘Molecular “vitalism”’, *Cell*, 100(1), pp. 79–88. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81685-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81685-2).
- Klunder, B. *et al.* (2013) ‘GDI-Mediated Cell Polarization in Yeast Provides Precise Spatial and Temporal Control of Cdc42 Signaling’, *PLOS Computational Biology*, 9(12), p. e1003396. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003396>.
- Knetsch, M.L. *et al.* (2001) ‘The Dictyostelium Bcr/Abr-related protein DRG regulates both Rac- and Rab-dependent pathways’, *The EMBO journal*, 20(7), pp. 1620–1629. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1620>.
- Kruse, K. (2002) ‘A dynamic model for determining the middle of Escherichia coli.’, *Biophysical Journal*, 82(2), pp. 618–627.

- Kruse, K. *et al.* (2005) ‘Generic theory of active polar gels: a paradigm for cytoskeletal dynamics’, *The European Physical Journal E*, 16(1), pp. 5–16. Available at: <https://doi.org/10.1140/epje/e2005-00002-5>.
- Kumar, M., Mommer, M.S. and Sourjik, V. (2010) ‘Mobility of Cytoplasmic, Membrane, and DNA-Binding Proteins in Escherichia coli’, *Biophysical Journal*, 98(4), pp. 552–559. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.002>.
- Kuo, C.-C. *et al.* (2014) ‘Inhibitory GEF phosphorylation provides negative feedback in the yeast polarity circuit’, *Current biology : CB*, 24(7), pp. 753–759. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.024>.
- Lamas, I. *et al.* (2020) ‘Optogenetics reveals Cdc42 local activation by scaffold-mediated positive feedback and Ras GTPase’, *PLOS Biology*, 18(1), p. e3000600. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000600>.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996) ‘Cell migration: a physically integrated molecular process’, *Cell*, 84(3), pp. 359–369. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81280-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81280-5).
- Lawson, C.D. and Ridley, A.J. (2018) ‘Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion’, *The Journal of Cell Biology*, 217(2), pp. 447–457. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201612069>.
- Lee, E. *et al.* (2003) ‘RacB Regulates Cytoskeletal Function in Dictyostelium spp.’, *Eukaryotic Cell*, 2(3), pp. 474–485. Available at: <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.474-485.2003>.
- Lee, S. *et al.* (2004) ‘Dictyostelium PAKc Is Required for Proper Chemotaxis’, *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), pp. 5456–5469. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-04-0323>.
- Lee, S.F. *et al.* (1996) ‘Cloning and characterization of a Dictyostelium myosin I heavy chain kinase activated by Cdc42 and Rac’, *The Journal of Biological Chemistry*, 271(43), pp. 27044–27048. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.43.27044>.
- Letort, G. *et al.* (2015) ‘Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton’, *F1000Research*, 4, p. F1000 Faculty Rev-940. Available at: <https://doi.org/10.12688/f1000research.6374.1>.
- Li, L., Nørrelykke, S.F. and Cox, E.C. (2008) ‘Persistent Cell Motion in the Absence of External Signals: A Search Strategy for Eukaryotic Cells’, *PLOS ONE*, 3(5), p. e2093. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002093>.
- Li, R. and Bowerman, B. (2010) ‘Symmetry Breaking in Biology’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), p. a003475. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003475>.
- Liu, Y.-J. *et al.* (2015) ‘Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells’, *Cell*, 160(4), pp. 659–672. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.007>.

- Loose, M., Kruse, K. and Schwille, P. (2011) 'Protein self-organization: lessons from the min system', *Annual Review of Biophysics*, 40, pp. 315–336. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155332>.
- Loovers, H.M. *et al.* (2007) 'Regulation of phagocytosis in Dictyostelium by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog Dd5P4', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(5), pp. 618–628. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00546.x>.
- Ludbrook, S.B., Eccleston, J.F. and Strom, M. (1997) 'Cloning and Characterization of a rhoGAP Homolog from Dictyostelium discoideum \*', *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), pp. 15682–15686. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.15682>.
- Machacek, M. *et al.* (2009) 'Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion', *Nature*, 461(7260), pp. 99–103. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08242>.
- Machesky, L.M. *et al.* (1999) 'Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), pp. 3739–3744. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3739>.
- Maiuri, P. *et al.* (2015) 'Actin flows mediate a universal coupling between cell speed and cell persistence', *Cell*, 161(2), pp. 374–386. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.056>.
- Marée, A.F.M. *et al.* (2006) 'Polarization and movement of keratocytes: a multiscale modelling approach', *Bulletin of Mathematical Biology*, 68(5), pp. 1169–1211. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11538-006-9131-7>.
- Marinović, M. *et al.* (2016) 'Quantitative imaging of Rac1 activity in Dictyostelium cells with a fluorescently labelled GTPase-binding domain from DPAKa kinase', *Histochemistry and Cell Biology*, 146(3), pp. 267–279. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1440-9>.
- Martin-Belmonte, F. and Mostov, K. (2008) 'Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis', *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), pp. 227–234. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.001>.
- McCaffrey, L.M. and Macara, I.G. (2012) 'Signaling pathways in cell polarity', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), p. a009654. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009654>.
- McKane, A.J. and Newman, T.J. (2005) 'Predator-Prey Cycles from Resonant Amplification of Demographic Stochasticity', *Physical Review Letters*, 94(21), p. 218102. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.94.218102>.
- Meinhardt, H. and Gierer, A. (2000) 'Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition', *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 22(8), pp. 753–760. Available at: [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200008\)22:8<753::AID-BIES9>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200008)22:8<753::AID-BIES9>3.0.CO;2-Z).
- Meyer, C.D. (2010) *Matrix analysis and applied linear algebra*. Har/Cdr edition. Philadelphia: SIAM: Society for Industrial and Applied Mathematics.

- Miao, Y. *et al.* (2019) ‘Wave patterns organize cellular protrusions and control cortical dynamics’, *Molecular Systems Biology*, 15(3), p. e8585. Available at: <https://doi.org/10.15252/msb.20188585>.
- Michaelson, D. *et al.* (2001) ‘Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding’, *The Journal of Cell Biology*, 152(1), pp. 111–126. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.152.1.111>.
- Milo, R. (2013) ‘What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values’, *Bioessays*, 35(12), pp. 1050–1055. Available at: <https://doi.org/10.1002/bies.201300066>.
- Mogilner, A. and Oster, G. (1996) ‘Cell motility driven by actin polymerization.’, *Biophysical Journal*, 71(6), pp. 3030–3045.
- Mondal, S. *et al.* (2010) ‘Regulation of the Actin Cytoskeleton by an Interaction of IQGAP Related Protein GAPA with Filamin and Cortexillin I’, *PLOS ONE*, 5(11), p. e15440. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015440>.
- Mondal, S., Hsiao, K. and Goueli, S.A. (2015) ‘A Homogenous Bioluminescent System for Measuring GTPase, GTPase Activating Protein, and Guanine Nucleotide Exchange Factor Activities’, *Assay and Drug Development Technologies*, 13(8), pp. 444–455. Available at: <https://doi.org/10.1089/adt.2015.643>.
- Mori, Y., Jilkine, A. and Edelstein-Keshet, L. (2008) ‘Wave-Pinning and Cell Polarity from a Bistable Reaction-Diffusion System’, *Biophysical Journal*, 94(9), pp. 3684–3697. Available at: <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120824>.
- Mori, Y., Jilkine, A. and Edelstein-Keshet, L. (2011) ‘ASYMPTOTIC AND BIFURCATION ANALYSIS OF WAVE-PINNING IN A REACTION-DIFFUSION MODEL FOR CELL POLARIZATION’, *SIAM journal on applied mathematics*, 71(4), pp. 1401–1427. Available at: <https://doi.org/10.1137/10079118X>.
- Morin, X. and Bellaïche, Y. (2011) ‘Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development’, *Developmental Cell*, 21(1), pp. 102–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.012>.
- Müller-Taubenberger, A. *et al.* (2002) ‘Differential localization of the Dictyostelium kinase DPAKa during cytokinesis and cell migration’, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(7–8), pp. 751–763. Available at: <https://doi.org/10.1023/a:1024475628061>.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. (1998) ‘The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), pp. 6181–6186. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6181>.
- Myers, S.A. *et al.* (2005) ‘A Dictyostelium Homologue of WASP Is Required for Polarized F-Actin Assembly during Chemotaxis’, *Molecular Biology of the Cell*, 16(5), pp. 2191–2206. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-09-0844>.



- Narumiya, S., Tanji, M. and Ishizaki, T. (2009) 'Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion', *Cancer Metastasis Reviews*, 28(1–2), pp. 65–76. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9170-7>.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) 'Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia', *Cell*, 81(1), pp. 53–62. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90370-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4).
- Noegel, A.A. and Schleicher, M. (2000) 'The actin cytoskeleton of Dictyostelium: a story told by mutants', *Journal of Cell Science*, 113(5), pp. 759–766. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.113.5.759>.
- Novák, B. and Tyson, J.J. (2008) 'Design principles of biochemical oscillators', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(12), pp. 981–991. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2530>.
- Otsuji, M. *et al.* (2007) 'A Mass Conserved Reaction–Diffusion System Captures Properties of Cell Polarity', *PLOS Computational Biology*, 3(6), p. e108. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030108>.
- Ozbudak, E.M., Becskei, A. and van Oudenaarden, A. (2005) 'A System of Counteracting Feedback Loops Regulates Cdc42p Activity during Spontaneous Cell Polarization', *Developmental Cell*, 9(4), pp. 565–571. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.08.014>.
- Pablo, M., Ramirez, S.A. and Elston, T.C. (2018) 'Particle-based simulations of polarity establishment reveal stochastic promotion of Turing pattern formation', *PLOS Computational Biology*, 14(3), p. e1006016. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006016>.
- Palmieri, S.J. *et al.* (2000) 'Mutant Rac1B expression in Dictyostelium: effects on morphology, growth, endocytosis, development, and the actin cytoskeleton', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 46(4), pp. 285–304. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0169\(200008\)46:4<285::AID-CM6>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-0169(200008)46:4<285::AID-CM6>3.0.CO;2-N).
- Para, A. *et al.* (2009) 'Dictyostelium Dock180-related RacGEFs regulate the actin cytoskeleton during cell motility', *Molecular Biology of the Cell*, 20(2), pp. 699–707. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0899>.
- Park, K.C. *et al.* (2004) 'Rac regulation of chemotaxis and morphogenesis in Dictyostelium', *The EMBO Journal*, 23(21), pp. 4177–4189. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600368>.
- Peng, X. *et al.* (2021) 'The interplay between IQGAP1 and small GTPases in cancer metastasis', *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 135, p. 111243. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111243>.
- Pertz, O. *et al.* (2006) 'Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells', *Nature*, 440(7087), pp. 1069–1072. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04665>.

- Peskin, C.S., Odell, G.M. and Oster, G.F. (1993) 'Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet', *Biophysical Journal*, 65(1), pp. 316–324. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81035-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81035-X).
- Plak, K. *et al.* (2013) 'GxcC connects Rap and Rac signaling during Dictyostelium development', *BMC Cell Biology*, 14(1), p. 6. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-6>.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (2009) 'Actin, a central player in cell shape and movement', *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), pp. 1208–1212. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1175862>.
- Pollitt, A.Y. and Insall, R.H. (2009) 'WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly', *Journal of Cell Science*, 122(15), pp. 2575–2578. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.023879>.
- Prigogine, I. *et al.* (1969) 'Symmetry Breaking Instabilities in Biological Systems', *Nature*, 223(5209), pp. 913–916. Available at: <https://doi.org/10.1038/223913a0>.
- Prigogine, I. and Nicolis, G. (1967) 'On Symmetry-Breaking Instabilities in Dissipative Systems', *The Journal of Chemical Physics*, 46(9), pp. 3542–3550. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.1841255>.
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004) 'Cell migration: Rho GTPases lead the way', *Developmental Biology*, 265(1), pp. 23–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.06.003>.
- Rappel, W.-J. and Edelstein-Keshet, L. (2017) 'Mechanisms of Cell Polarization', *Current Opinion in Systems Biology*, 3, pp. 43–53. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.03.005>.
- Reichenbach, T., Mobilia, M. and Frey, E. (2006) 'Coexistence versus extinction in the stochastic cyclic Lotka-Volterra model', *Physical Review E*, 74(5), p. 051907. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.74.051907>.
- Ridley, A.J. *et al.* (1992) 'The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling', *Cell*, 70(3), pp. 401–410. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90164-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90164-8).
- Ridley, A.J. and Hall, A. (1992) 'The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors', *Cell*, 70(3), pp. 389–399. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90163-7).
- Rivero, F. and Somesh, B.P. (2002) 'Signal transduction pathways regulated by Rho GTPases in Dictyostelium', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(7–8), pp. 737–749. Available at: <https://doi.org/10.1023/a:1024423611223>.
- Rivero, F. and Xiong, H. (2016) 'Rho Signaling in Dictyostelium discoideum', *International Review of Cell and Molecular Biology*, 322, pp. 61–181. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.004>.

- de la Roche, M. *et al.* (2005) ‘Cellular Distribution and Functions of Wild-Type and Constitutively Activated Dictyostelium PakB’, *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), pp. 238–247. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-06-0534>.
- Rohatgi, R. *et al.* (1999) ‘The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly’, *Cell*, 97(2), pp. 221–231. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80732-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80732-1).
- Rossman, K.L., Der, C.J. and Sondek, J. (2005) ‘GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2), pp. 167–180. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm1587>.
- Ruprecht, V. *et al.* (2015) ‘Cortical contractility triggers a stochastic switch to fast amoeboid cell motility’, *Cell*, 160(4), pp. 673–685. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.008>.
- Schiesser, W.E. and Griffiths, G.W. (2009) *A Compendium of Partial Differential Equation Models: Method of Lines Analysis with Matlab*. Cambridge: Cambridge University Press. Available at: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511576270>.
- Schirenbeck, A. *et al.* (2005) ‘The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia’, *Nature Cell Biology*, 7(6), pp. 619–625. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1266>.
- Seastone, D.J. *et al.* (1998) ‘Overexpression of a novel rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in Dictyostelium discoideum’, *Molecular Biology of the Cell*, 9(10), pp. 2891–2904. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.9.10.2891>.
- Seastone, D.J. *et al.* (2001) ‘The WASp-like protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in Dictyostelium’, *Journal of Cell Science*, 114(Pt 14), pp. 2673–2683. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.114.14.2673>.
- Slaughter, B.D. *et al.* (2009) ‘Dual modes of cdc42 recycling fine-tune polarized morphogenesis’, *Developmental Cell*, 17(6), pp. 823–835. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.022>.
- Solve stiff differential equations and DAEs — variable order method - MATLAB ode15s* (no date). Available at: <https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/ode15s.html> (Accessed: 29 August 2022).
- Somesh, B.P. *et al.* (2006) ‘RacG Regulates Morphology, Phagocytosis, and Chemotaxis’, *Eukaryotic Cell*, 5(10), pp. 1648–1663. Available at: <https://doi.org/10.1128/EC.00221-06>.
- Song, Y., Jiang, H. and Yuan, Y. (2019) ‘TURING-HOPF BIFURCATION IN THE REACTION-DIFFUSION SYSTEM WITH DELAY AND APPLICATION TO A DIFFUSIVE PREDATOR-PREY MODEL’, *Journal of Applied Analysis & Computation*, 9(3), pp. 1132–1164. Available at: <https://doi.org/10.11948/2156-907X.20190015>.
- Srinivasan, S. *et al.* (2003) ‘Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis’, *Journal of Cell Biology*, 160(3), pp. 375–385. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200208179>.

- Svitkina, T.M. *et al.* (1997) ‘Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation’, *The Journal of Cell Biology*, 139(2), pp. 397–415. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.139.2.397>.
- Sweeney, H.L. and Holzbaaur, E.L.F. (2018) ‘Motor Proteins’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(5), p. a021931. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021931>.
- Tang, H. *et al.* (2013) ‘Loss of Scar/WAVE complex promotes N-WASP- and FAK-dependent invasion’, *Current biology: CB*, 23(2), pp. 107–117. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.059>.
- Tang, K. *et al.* (2018) ‘Paxillin phosphorylation at serine 273 and its effects on Rac, Rho and adhesion dynamics’, *PLOS Computational Biology*, 14(7), p. e1006303. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006303>.
- Thomas, J.W. (1995) *Numerical Partial Differential Equations: Finite Difference Methods*. 1st ed. 1995. Corr. 2nd printing 1998 edition. New York: Springer.
- Titus, M.A. and Goodson, H.V. (2017) ‘An evolutionary perspective on cell migration: Digging for the roots of amoeboid motility’, *Journal of Cell Biology*, 216(6), pp. 1509–1511. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201704112>.
- Tjhung, E., Marenduzzo, D. and Cates, M.E. (2012) ‘Spontaneous symmetry breaking in active droplets provides a generic route to motility’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), pp. 12381–12386. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1200843109>.
- Turing, A.M. (1952) ‘The chemical basis of morphogenesis’, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 237(641), pp. 37–72. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.1952.0012>.
- Ura, S. *et al.* (2012) ‘Pseudopod growth and evolution during cell movement is controlled through SCAR/WAVE dephosphorylation’, *Current biology : CB*, 22(7), pp. 553–561. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.020>.
- Usatyuk, P.V. *et al.* (2009) ‘Phospholipase D-mediated Activation of IQGAP1 through Rac1 Regulates Hyperoxia-induced p47phox Translocation and Reactive Oxygen Species Generation in Lung Endothelial Cells’, *The Journal of Biological Chemistry*, 284(22), pp. 15339–15352. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.005439>.
- Veltman, D.M. *et al.* (2012) ‘SCAR knockouts in Dictyostelium: WASP assumes SCAR’s position and upstream regulators in pseudopods’, *The Journal of Cell Biology*, 198(4), pp. 501–508. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201205058>.
- Verkhovsky, A.B., Svitkina, T.M. and Borisov, G.G. (1999) ‘Network contraction model for cell translocation and retrograde flow’, *Biochemical Society Symposium*, 65, pp. 207–222.
- Vlahou, G. and Rivero, F. (2006) ‘Rho GTPase signaling in Dictyostelium discoideum: insights from the genome’, *European Journal of Cell Biology*, 85(9–10), pp. 947–959. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.04.011>.

- Wang, Y. *et al.* (2013) 'Rho GTPases orient directional sensing in chemotaxis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), pp. E4723–E4732. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1312540110>.
- Weber, A. and Franzini-Armstrong, C. (2002) 'Hugh E. Huxley: birth of the filament sliding model of muscle contraction', *Trends in Cell Biology*, 12(5), pp. 243–245. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(02\)02270-5](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(02)02270-5).
- Wedlich-Soldner, R. *et al.* (2004) 'Robust cell polarity is a dynamic state established by coupling transport and GTPase signaling', *Journal of Cell Biology*, 166(6), pp. 889–900. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200405061>.
- Weiner, O.D. *et al.* (2002) 'A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity', *Nature Cell Biology*, 4(7), pp. 509–513. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb811>.
- Weiner, O.D. *et al.* (2007) 'An Actin-Based Wave Generator Organizes Cell Motility', *PLOS Biology*, 5(9), p. e221. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050221>.
- Welch, C.M. *et al.* (2011) 'Imaging the coordination of multiple signaling activities in living cells', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(11), pp. 749–756. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3212>.
- White, C.D., Erdemir, H.H. and Sacks, D.B. (2012) 'IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions', *Cellular Signalling*, 24(4), pp. 826–834. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.005>.
- Wickström, S.A. *et al.* (2010) 'Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae', *Developmental Cell*, 19(4), pp. 574–588. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.007>.
- Witte, K., Strickland, D. and Glotzer, M. (2017) 'Cell cycle entry triggers a switch between two modes of Cdc42 activation during yeast polarization', *eLife*. Edited by S. McCormick, 6, p. e26722. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.26722>.
- Woods, B. *et al.* (2015) 'Polarity establishment requires localized activation of Cdc42', *The Journal of Cell Biology*, 211(1), pp. 19–26. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201506108>.
- Woods, B. and Lew, D.J. (2019) 'Polarity establishment by Cdc42: Key roles for positive feedback and differential mobility', *Small GTPases*, 10(2), pp. 130–137. Available at: <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1275370>.
- Wu, C.-F. *et al.* (2015) 'Role of competition between polarity sites in establishing a unique front', *eLife*. Edited by M. Balasubramanian, 4, p. e11611. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.11611>.
- Wu, C.-F. and Lew, D.J. (2013) 'Beyond symmetry-breaking: competition and negative feedback in GTPase regulation', *Trends in Cell Biology*, 23(10), pp. 476–483. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.05.003>.

- Xu, B. and Jilkin, A. (2018) 'Modeling the Dynamics of Cdc42 Oscillation in Fission Yeast', *Biophysical Journal*, 114(3), pp. 711–722. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.12.007>.
- Xu, B., Kang, H.-W. and Jilkin, A. (2019) 'Comparison of Deterministic and Stochastic Regime in a Model for Cdc42 Oscillations in Fission Yeast', *Bulletin of Mathematical Biology*, 81(5), pp. 1268–1302. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11538-019-00573-5>.
- Yang, Y. and Wu, M. (2018) 'Rhythmicity and waves in the cortex of single cells', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 373(1747), p. 20170116. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0116>.
- Yodanis, C. L. (1982) 'Symmetry, an entropy-like measure of visual symmetry', *Perception & Psychophysics*, 32(3), pp. 230–240. Available at: <https://doi.org/10.3758/BF03206227>.

## ŽIVOTOPIS

Marko Šoštar rođen je 30.01.1985. u Zagrebu, gdje je završio osnovnu, srednju školu, te studij fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu s temom "Fluorescentna korelacijska spektroskopija biomolekula". Od 2012. do 2013. godine volontirao je u Laboratoriju za lasersku spektroskopiju Instituta za fiziku. Od 2013. radi na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, prvo kao stručni suradnik na FP7 projektu "Enhancement of the Innovation Potential in SEE through new Molecular Solutions in Research and Development (InnoMol)", a zatim od 2016. kao znanstveni novak. Sudjelovao je na 9 međunarodnih konferencija i radionica, te objavio 5 znanstvenih radova. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatskog mikroskopijskog društva, i Hrvatskog biofizičkog društva. U sklopu doktorskog studija sudjelovao je u nastavi kao asistent na Fizičkom praktikumu za nastavničke smjerove.

### Publikacije:

Marinović, M. *et al.* (2016) 'Quantitative imaging of Rac1 activity in Dictyostelium cells with a fluorescently labelled GTPase-binding domain from DPAKa kinase', *Histochemistry and Cell Biology*, 146(3), pp. 267–279. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1440-9>.

Filić, V. *et al.* (2018) 'Modulation of small GTPase activity by NME proteins', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 98(5), pp. 589–601. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0023-x>.

Marinović, M. *et al.* (2019) 'IQGAP-related protein IqgC suppresses Ras signaling during large-scale endocytosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(4), pp. 1289–1298. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1810268116>.

Radić, M. *et al.* (2020) 'The Subcellular Localization and Oligomerization Preferences of NME1/NME2 upon Radiation-Induced DNA Damage', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), p. 2363. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21072363>.

Jagić, M. *et al.* (2022) 'BPM1 regulates RdDM-mediated DNA methylation via a cullin 3 independent mechanism', *Plant Cell Reports*, 41(11), pp. 2139–2157. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02911-9>.