

Dinamika proteina Rac1 te njena ovisnost o obliku stanice

Ivšić, Blaž

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:498904>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Blaž Ivšić

DINAMIKA PROTEINA Rac1 TE NJENA
OVISNOST O OBLIKU STANICE

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
FIZIKA; SMJER ISTRAŽIVAČKI

Blaž Ivšić

Diplomski rad

**Dinamika proteina Rac1 te njena
ovisnost o obliku stanice**

Voditelj diplomskog rada: dr. sc. Igor Weber

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____

2. _____

3. _____

Datum polaganja: _____

Zagreb, 2019.

Zahvaljujem se svom mentoru dr. sc. Igoru Weberu na ukazanoj prilici i podršci prilikom pisanja ovog diplomskog rada, kao i njegovom doktorandu mag. Marku Šoštaru koji me uveo u ovo područje i usmjeravao prilikom izrade rada. Također htio bih zahvaliti svojim prijateljima Davidu i Filipu koji su bili uz mene tijekom ovih pet godina, a za kraj bih se posebno zahvalio mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog mog života.

Sažetak

Kretanje stanica ovisi o polimerizaciji aktina, a nju reguliraju signalni proteini poput malih GTPaza. Poznato je da je aktivnost tih proteina u eukariotskim stanicama strukturirana u prostorno-vremenske obrasce poput stajnih i putujućih valova koji služe kao predlošci za polarizaciju aktinskog citoskeleta u funkcionalne domene. Dinamika male GTPaze Rac1 prethodno je modelirana pomoću reakcijsko-difuzijskih jednadžbi u jednoj prostornoj dimenziji, te je ustanovljeno da je pojava obrazaca uzrokovana dinamičkim nestabilnostima proizašlim iz nelinearnih interakcija među proteinima, ali je pritom zanemaren utjecaj promjenjivog oblika stanice na dinamiku sustava. U ovom diplomskom radu poopćen je postojeći model tako da su opisane dvije prostorne dimenzije. Potom je razvijena numerička metoda za ispitivanje dinamike signalnih proteina i istraženo je na koji način oblik stanice utječe na pojavu obrazaca GTPaze Rac1. Teorijski su predviđeni različiti prostorno-vremenski obrasci, uključujući putujuće i stajne valove. Također, laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopijom eksperimentalno je proučavana dinamika fluorescentno obilježene sonde koja detektira aktivni oblik GTPaze Rac1 u stanicama *Dictyostelium* tijekom slobodnog kretanja. Dobiveni eksperimentalni rezultati uspoređeni su s teorijskim rezultatima te je zaključeno da uvedeni model dobro opisuje različite obrasce. Ključne riječi: reakcijsko-difuzijski sustavi, metoda konačnih elemenata, aktinski citoskelet, stanično kretanje, Rho GTPaze

Dynamics of Rac1 protein and its dependence on cell shape

Abstract

Cell movement depends on actin polymerization, which is regulated by signal proteins such as small GTPases. It is known that activity of these proteins in eukaryotic cells is structured in spatiotemporal patterns like travelling and stationary waves, which serve as templates for polarization of the actin cytoskeleton into functional domains. A model of Rac1 GTPase dynamics has been previously developed using reaction-diffusion equations in one dimension, which indicated that patterns are formed due to dynamic instabilities originating from non-linear protein interactions. However, a possible influence of cell shape on the system dynamics was not taken into account using this one-dimensional model. In this Diploma thesis we examine the influence of cell geometry on the pattern formation. Laser confocal microscopy was used to obtain data on the dynamics of a fluorescently labeled probe that specifically binds to the active form of Rac1 GTPase in vegetative *Dictyostelium* cells. Based on the existing model, a numerical method has been developed to investigate signal protein dynamics in two dimensions and determine how the cell shape influences formation of Rac1 GTPase patterns.

Keywords: reaction–diffusion systems, finite element method, actin cytoskeleton, cell motility, rho GTPases

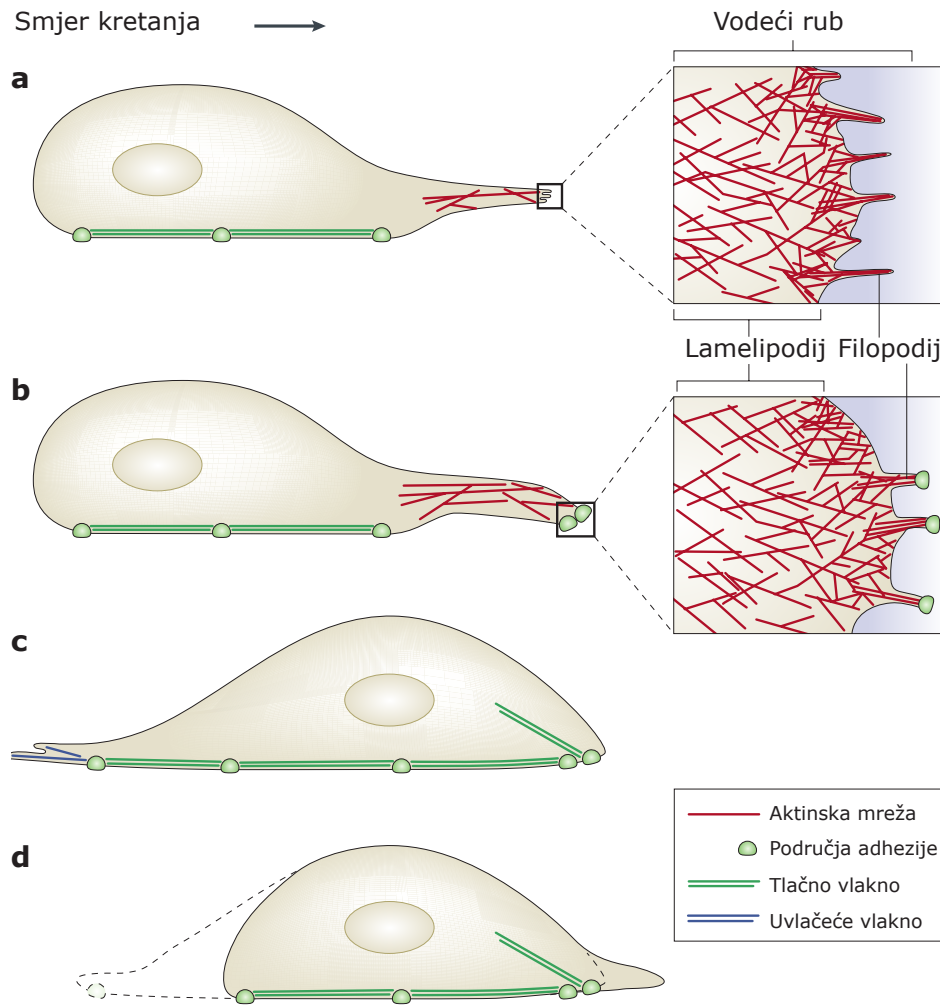
Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Stanično kretanje i aktinski citoskelet	1
1.2	Regulacija aktinskog citoskeleta	5
1.3	<i>Dictyostelium discoideum</i>	7
1.4	Reakcijsko-difuzijski sustavi u biologiji	10
1.5	Postojeći modeli dinamike reakcijsko-difuzijskih sustava u staničnom kretanju	12
1.6	Motivacija i cilj rada	14
2	Teorijski model	15
2.1	Model stanične polarizacije	15
2.2	Pristupi modeliranju reakcijsko-difuzijskih sustava	17
2.3	Matematički formalizam metode konačnih elemenata	18
3	Rezultati i diskusija	22
3.1	Usporedba eksperimentalnih rezultata i numeričkih simulacija	22
3.2	Ovisnost dinamike aktivne forme Rac1 o geometriji sustava	25
4	Zaključak	28
	Dodaci	29
A	Snimanje stanica	29
B	Analiza snimaka	30
C	Numeričke simulacije	31
D	Primjer implementacije metode konačnih elemenata	32
	Literatura	44

1 Uvod

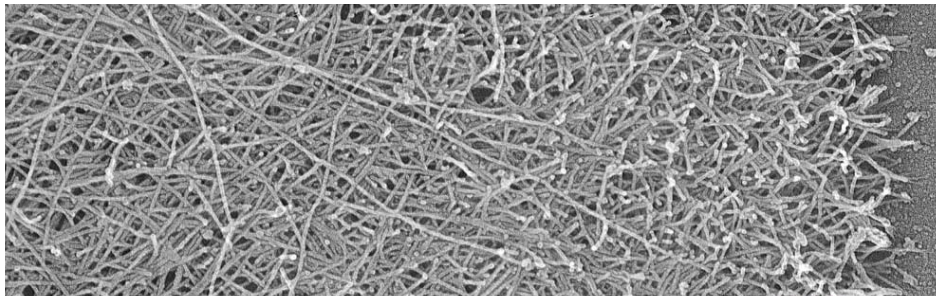
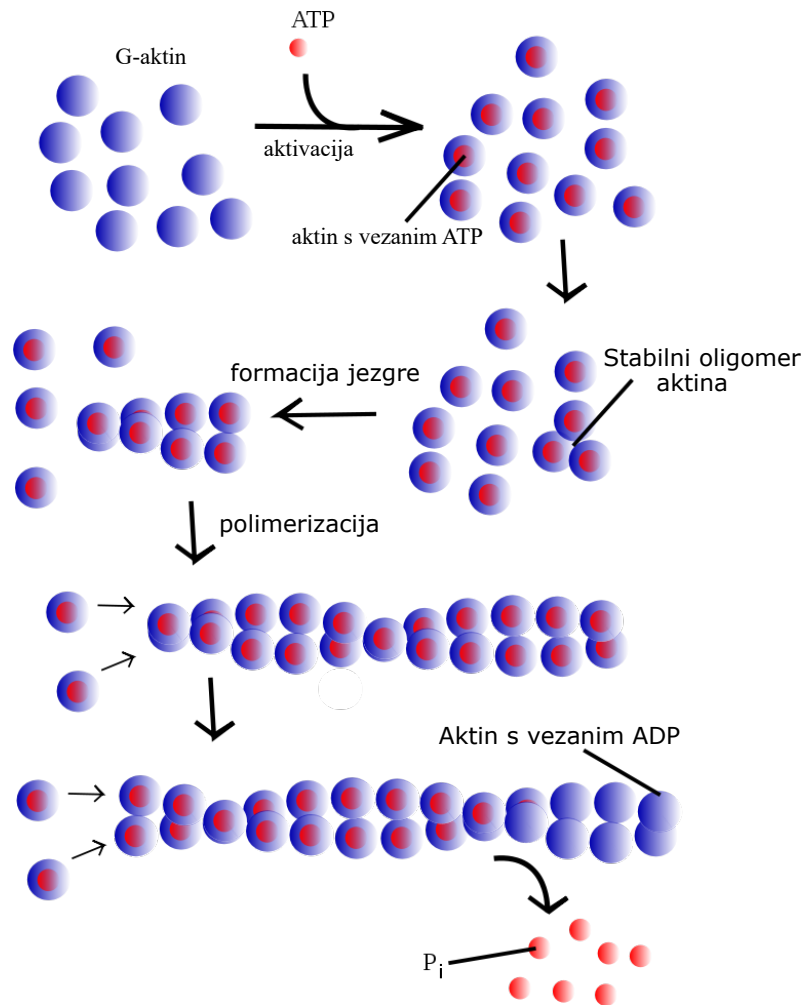
1.1 Stanično kretanje i aktinski citoskelet

Stanično kretanje jedno je od osnovnih svojstava gotovo svih eukariotskih stanica te je ključno u velikom broju bioloških procesa. Neki od primjera staničnog kretanja su: puzanje ameba, migracija stanica tijekom embrionalnog razvoja, kretanje leukocita i makrofaga prema mjestu infekcije unutar organizma i migracija stanica raka tijekom metastaziranja malignih tumora. Kretanje stanice sastoji se od koordiniranog ciklusa koji se može podijeliti u nekoliko faza prikazanih na slici 1.1. Najprije se stanična ispupčenja poput pseudopodija, lamelipodija i filopodija protegnu od vodećeg ruba stanice i pričvrste za podlogu po kojoj se stanica kreće. U idućem se koraku stražnji kraj stanice odvaja od podloge te se uvlači prema vodećem kraju, nakon čega se cijeli ciklus ponovi [1]. Vodeću ulogu u ovom procesu obavlja aktinski citoskelet koji čini strukturnu okosnicu stanice, služi kao potporanj koji određuje oblik stanice i omogućava opću reorganizaciju citoplazme. Osim u proces staničnog kretanja, aktinski citoskelet je uključen i u transport organela unutar stanice. Napomenimo kako aktinski citoskelet nema stalnu strukturu i formu već se neprestano mijenja i prilagođava, te time utječe na kretanje i promjenu oblika stanice [1]. Glavna građevna jedinica citoskeleta je aktin, najzastupljeniji protein u stanici. Aktin je veoma dobro očuvan kroz evoluciju te mu je sekvenca i struktura gotovo ista u svim eukariotskim organizmima, od kvasaca do ljudi [2], iako u višim organizmima postoji nekoliko različitih izoformi. Unutar stanica aktin postoji u dva oblika, kao monomer (globularni G aktin) te kao vlakno (vlaknasti F aktin). Dinamika aktinskog citoskeleta određena je regulacijom ravnoteže između ove dvije vrste aktina. Aktin polimerizira stvarajući tanka gipka i savitljiva vlakna promjera otprilike 7 nm i duljine do nekoliko mikrona, kao što je prikazano na slici 1.2. Aktinsko je vlakno asimetrično te ima izgled lijeve dvolančane uzvojnice u kojoj su podjedinice razmaknute jedna u odnosu na drugu za pola svoje duljine. Budući da je vlakno asimetrično, razlikujemo njegov (+) i (–) kraj, što je bitno zbog kretanja molekularnih motora miozina u točno određenom smjeru kao i zbog usmjerene polimerizacije aktina. Monomeri aktina vežu na sebe ATP koji hidrolizira u ADP nakon združivanja u vlakno. Iako ATP nije nužan za polimerizaciju, monomeri aktina na koje je ATP vezan lakše polimeriziraju [1]. U stacionarnom stanju F-aktin raste na (+) kraju i



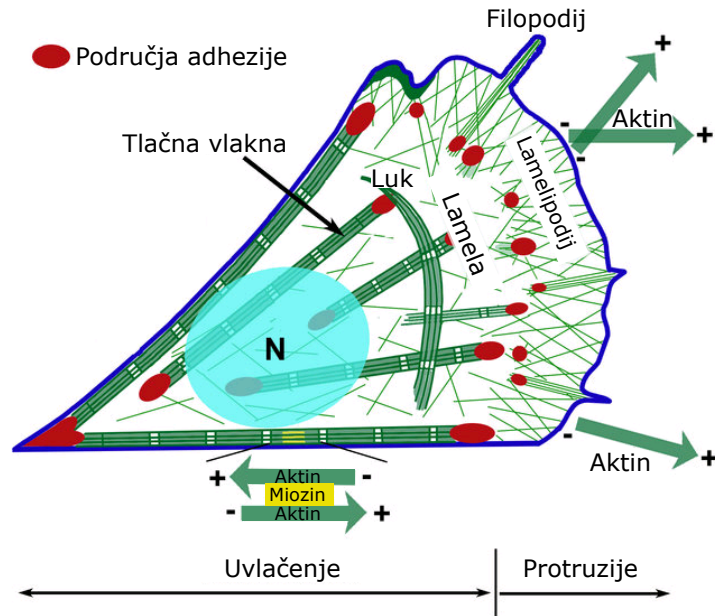
Slika 1.1: Shematski prikaz kretanja stanice. Preuzeto iz [3].

spontano se razgrađuje na (-) kraju [2]. Ovaj fenomen nazivamo hodanje u mjestu odnosno „treadmilling“. Cijela mreža aktinskih vlakana može se razgrađivati i sastavljati brzinom reda veličine $1 \mu m/s$ koja je proporcionalna koncentraciji monomera u citoplazmi [4]. Pojedina se aktinska vlakna udružuju u dva glavna strukturalna tipa koje nazivamo aktinski snopovi i aktinske mreže (slika 1.3). Obje strukture nastaju pretežno na vodećem kraju stanice tijekom polimerizacije aktina. Aktinska vlakna čine okosnicu različitih ispupčenja na staničnoj membrani koja omogućuju kretanje stanice, često kao odgovor na podražaje iz okoline. Razlikujemo nekoliko tipova tih struktura: pseudopodiji su cilindrična izbočenja promjenjive dužine, lamelipodiji su široke i tanke ekstenzije membrane, dok su filopodiji tanka izbočenja stanične membrane poduprta aktinskim snopovima [1]. Osim toga, većina stanica posjeduje specijalizirana područja membrane, tzv. područja adhezije, koja se dodiruju sa susjednim stanicama, dijelovima tkiva i ostalim vanjskim površinama. U mnogima od



Slika 1.2: Shematski prikaz polimerizacije aktinskih vlakana (gore) i slika aktinske mreže dobivena transmisijskom elektronskom mikroskopijom (dolje). Preuzeto iz [5], [6].

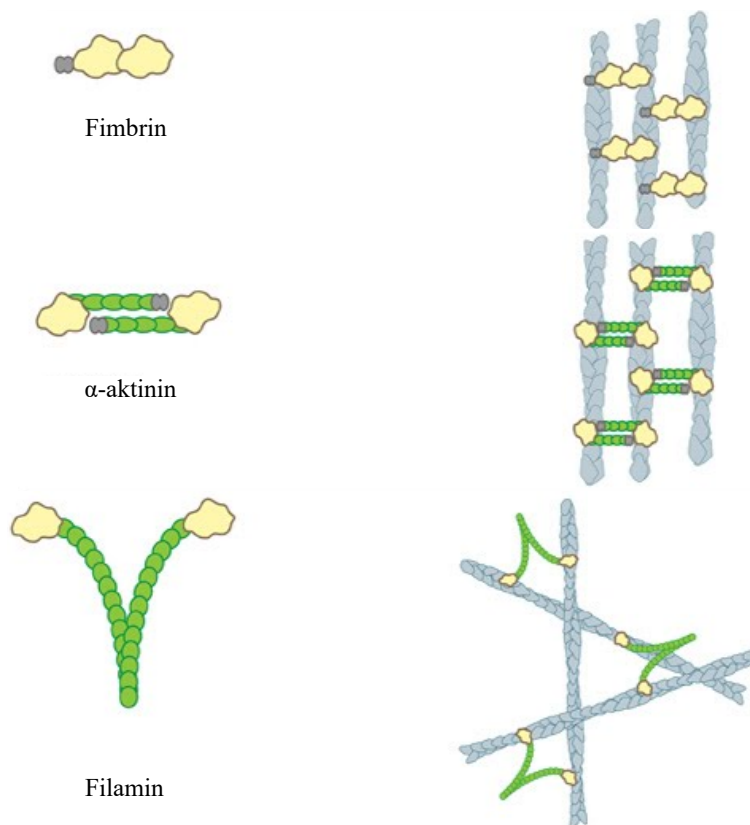
tih područja aktinska vlakna su pričvršćena za membranu čime se citoskelet „usidruje“ (slika 1.3). Kako bi se stanica mogla kretati, nužna je precizna koordinacija procesa usmjerene izgradnje i razgradnje aktinskog citoskeleta. Iako se polimerizacija aktinskih vlakana može promatrati in vitro, ona je do 100 puta brža u stanicama što ukazuje na postojanje dodatnih faktora uključenih u ovaj proces [1]. Proteine koji se vežu na aktin skupnim imenom nazivamo ABP (actin binding proteins). Njihova



Slika 1.3: Shematski prikaz aktinskog citoskeleta i njegovih elemenata. Preuzeto iz [7].

je uloga regulacija polimerizacije i depolimerizacije pojedinih aktinskih vlakana, njihovo povezivanje u strukture višeg reda, kao i razgradnja tih struktura. Na primjer, ADF/kofilin veže se na aktinska vlakna te povećava brzinu odvajanja monomera s (-) kraja, nakon čega ostaje vezan za G-aktin i koči njegovu ponovnu polimerizaciju. S druge strane, ovaj proces može dokinuti profilin koji potiče zamjenu ADP, vezanog za monomer, u ATP. Budući da se kofilin bolje veže na ADP aktin, profilin svojim djelovanjem potiče odvajanje G-aktina od kofilina i time posljedično polimerizaciju aktina. Bitan faktor u nastajanju razgranatih aktinskih mreža je Arp2/3 kompleks. Taj proteinski kompleks sastoji se od sedam proteina, veže se na postojeće aktinsko vlakno, te inicira novu polimerizaciju pod kutem od 70° u odnosu na vlakno na koje je vezan. Arp2/3 ima relativno nisku aktivnost koju katalizira u prvom redu protein SCAR/Wave iz porodice WASP. Proteini koji povezuju vlakna u snopove obično su mali i kruti što prisiljava vlakna da se poslože relativno blizu, dok su proteini koji organiziraju aktin u mreže veliki i savitljivi tako da mogu povezati čak i međusobno okomita vlakna. Prvi tip aktinskih snopova sadržava tijesno zbijena paralelna vlakna koja podupiru izbočine na membrani - filopodije. U tim snopovima aktinska vlakna imaju jednaku polarnost, tako da su (+) krajevi okrenuti prema staničnoj membrani, i često su povezana proteinom fimbrinom. Drugi tip aktinskih snopova sastavljen je

od šire razmaknutih antiparalelnih vlakana što omogućuje kontrakciju, a povezuje ih npr. α -aktinin. Aktin je u mrežama povezan proteinima kao što je filamin. Taj protein ima V-oblik i stvara ukrižene veze između međusobno okomitih aktinskih vlakana stvarajući labavu trodimenzionalnu strukturu koja čini aktinski korteks koji podupire staničnu membranu. Shematski prikazi ovih struktura dani su na slikama 1.3 i 1.4. Osim spomenute grupe vezivnih proteina ABP, bitnu ulogu u kontrakciji aktinskog citoskeleta imaju miozinski molekularni motori čija je važnost u staničnom kretanju prvi puta pokazana u mutantima amebe *Dictyostelium* [1].

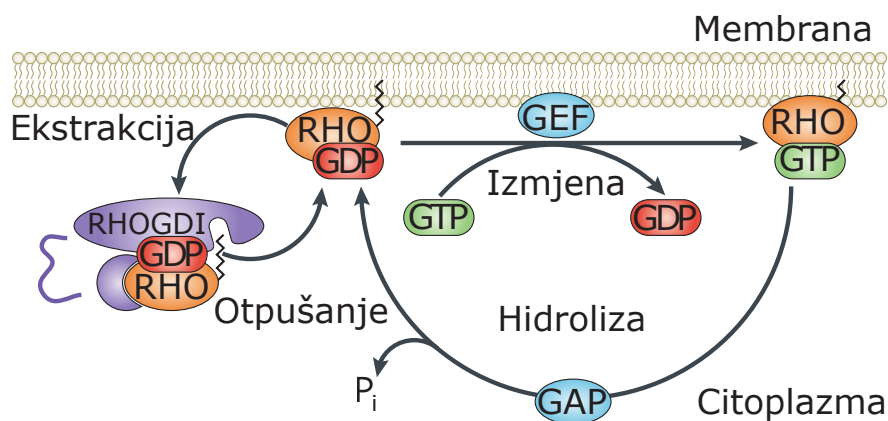


Slika 1.4: Shematski prikaz proteina koji vežu aktin. Preuzeto iz [8].

1.2 Regulacija aktinskog citoskeleta

Kako bi se stanica mogla usmjerenom kretati i mijenjati svoj oblik, potrebna je precizna regulacija struktura i proteina opisanih u prošlom poglavlju. Tu zadaću obavljaju kaskade međuproteinskih interakcija koje općenito nazivamo signalnim putevima. Vodeću ulogu u mnogim signalnim putevima koji reguliraju aktinski citoskelet imaju male GTPaze iz porodice Rho (tzv. Rho GTPaze), koja je dio superobitelji Ras. Poznato je da su u koordinaciju staničnog kretanja u brojnim organizmima i staničnim

tipovima uključeni proteini Rho, Rac i Cdc42 koji su članovi ove porodice. Protein Cdc42 uključen je u regulaciju polimerizacije aktinskih vlakana u snopovima što dolazi do izražaja npr. prilikom stanične diobe. Pokazano je da se stanice kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) kod kojih je Cdc42 nefunkcionalan ne mogu dijeliti [9]. Proteini iz grupe Rac stimuliraju stvaranje lamelipodija i uključeni su u ekstenziju membrane prilikom fagocitoze tijekom stvaranja tzv. endocitotskih čašica. U miševima s potisnutim genom *rac1* javljaju se defekti u ranoj fazi embrionalnog razvoja. U sisavcima



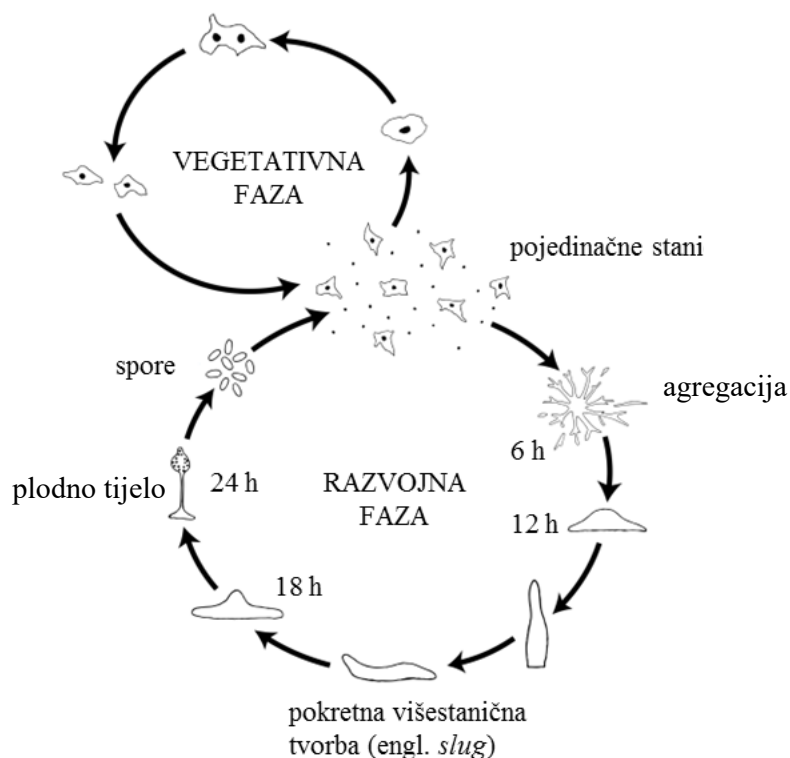
Slika 1.5: Shematski prikaz regulacije aktivnosti malih Rho GTPaza. Preuzeto iz [10].

postoje tri izoforme proteina Rho koje su uglavnom uključene u regulaciju kontraktilnih struktura. Uklanjanjem RhoB i RhoC u miševima s potisnutim RhoA dolazi do gubitka stresnih vlakana i fokalnih adhezija [9]. Rho GTPaze posjeduju velik afinitet za vezanje GTPa i GDPa te sadrže domenu za hidrolizu GTPa, međutim njihova intrinzična hidrolitička aktivnost je mala. Vezanje GTPa mijenja konformaciju ovih proteina što dovodi do njihove aktivacije i interakcije s ciljnim molekulama [9]. Općenito razlikujemo dvije konformacije malih GTPaza koje nazivamo aktivnom i neaktivnom. U aktivnom obliku za GTPazu je vezan GTP, dok je u neaktivnom obliku vezan GDP. Promjenu između ta dva oblika regulira nekoliko drugih proteina, među kojima su najbitniji: proteini koji pospješuju hidrolitičku aktivnost GTPaza (GAP), faktori koji potiču izmjenu vezanog GDPa za GTP (GEF), te faktori koji inhibiraju disocijaciju GDPa s GTPaze (GDI). Shematski prikaz interakcija ovih proteina prikazan je na slici 1.5. Proces aktivacije reguliran je faktorima koji potiču izmjenu nukleotida (GEFovi). Napomenimo kako je afinitet Rho GTPaza za GTP otprilike jednak onom za GDP, no kako je u stanici prisutno približno deset puta više GTPa u odnosu na GDP, djelova-

njem GEFova povećava se akumulacija GTPaza u aktivnom obliku. Kako bi se GTPaza mogla vratiti u neaktivno stanje treba doći do hidrolize vezanog GTPa, za što su odgovorni proteini koji povećavaju njihovu hidrolitičku aktivnost (GAPovi). Treći oblik regulacije GTPaza provode GDI proteini. Njihova je uloga ekstrahirati male GTPaze s membrane u citoplazmu i spriječiti njihovu ponovnu aktivaciju. Osim opisane regulacije Rho GTPaza, stanice osiguravaju pravilan rad cijelog sustava i kontrolom genske ekspresije pojedinih članova. Razina ekspresije proteina Rac1, RhoA te Cdc42 u svim je tkivima podjednaka, dok su razine drugih članova porodice Rho ovisne o vrsti tkiva odnosno stanica. Budući da su neki proteini porodice Rho nestabilni, transkripcijska je regulacija veoma bitna u svim stanicama [9]. U svom aktivnom obliku Rho GTPaze mogu međudjelovati s ciljnim proteinima, tzv. efektorima, i tako stimulirati ili kočiti određene procese unutar aktinskog citoskeleta. Signalni proteini porodice Rho djeluju nizvodno na mnoge grupe proteina kao što su kinaze, formini, te članove obitelji WASP. Identificirano je ukupno više od 70 takvih ciljnih molekula. Na primjer, Rho proteini vežu se na ROCK kinazu i time stimuliraju interakciju miozina II s aktinom što uvjetuje kontrakciju stanice, dok vezanjem na LIM kinazu omogućuju fosforilaciju kofilina. Rac1 i Cdc42 vežu se na PAK te time stimuliraju njezinu kinaznu aktivnost, dok formini, na koje se također vežu male GTPaze Rho, opskrbljuju (+) kraj rastućeg aktinskog filameta s aktinskim monomerima i tako djeluju kao tzv. aktinske polimeraze. Direktnim ili indirektnim vezanjem Rac1 i Cdc42 na proteine porodice WASP dolazi od aktivacije Arp2/3 kompleksa koji, kao što je već spomenuto, sudjeluje u stvaranju aktinskih mreža. Na reorganizaciju citoskeleta utječe i skupina proteina IQGAP koji spadaju u tzv. "scaffold" proteine. Ti proteini sadrže veći broj domena i na sebe mogu vezati preko 50 različitih proteina, između ostalih i male Rho GTPaze Rac1 i Cdc42. Postavljena je hipoteza da u stanicama *D. discoideum* IQGAP proteini DGAP1 i GAPA vezanjem aktivne forme Rac1 smanjuju količinu tog proteina raspoloživog za aktivaciju polimerizacije aktina [11].

1.3 *Dictyostelium discoideum*

Stanice organizma *Dictyostelium discoideum* predstavljaju odličan biološki sustav za proučavanje staničnog kretanja. Te su amebe veoma pokretljive, a njihov je aktinski citoskelet, uključujući i regulatorne proteine, srodan onom u stanicama ssa-



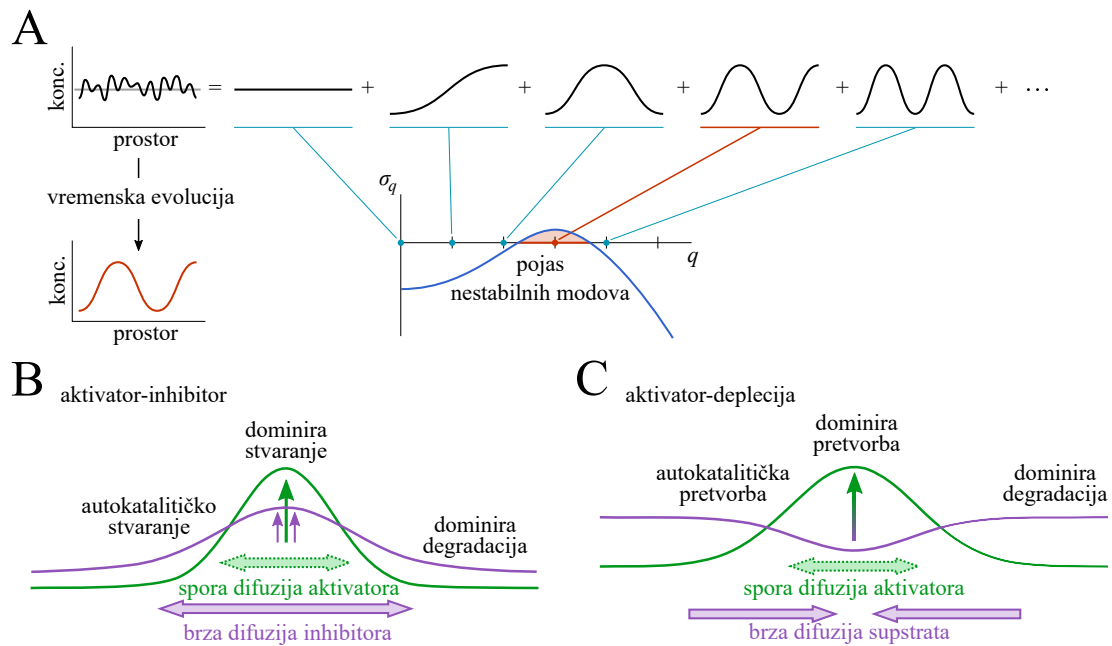
Slika 1.6: Shematski prikaz životnog ciklusa amebe *D. Discoideum*. Preuzeto iz [9]

vaca. Osim toga, njihov je životni ciklus kratak i haploidni genom sekvenciran, što omogućava efikasnu manipulaciju genima i time produkciju stanica previše izraženim odnosno potisnutim određenim proteinima. Također, metodama genetičkog inženjerstva moguće je obilježiti određene proteine fuzijom s fluorescentnim proteinima, te takve kimerne proteine pratiti pomoću fluorescencijske mikroskopije [12]. Prirodno stanište ameba *D. discoideum* je šumsko tlo, gdje se pojedinačne stanice hrane bakterijama i plijesni te se umnožavaju. Prilikom izgladnelosti, stanice počinju lučiti kemoatraktant cAMP i počinju se kretati prema centrima agregacije vođene gradijentom koncentracije kemoatraktanta. Taj se proces naziva kemotaksija. Tako se okuplja veći broj ameba koje formiraju višestanični organizam nalik pužu. Takav se puž može kretati, a nakon određenog vremena razvije se u duguljastu formu sa sporama na vrhu i tankom stabljikom koja je izgrađena od mrtvih stanica ispunjenih vakuolama. Osim diobe i razmnožavanja putem spora, primijećeno je kako se amebe *D. discoideum* u određenim uvjetima mogu međusobno spajati i formirati strukture koje nazivamo makrocistama. U različitim fazama životnog ciklusa ovih stanica razlikujemo nekoliko specifičnih načina kretanja od kojih ćemo pobliže razmotriti ke-

motaksiju te vegetativno kretanje. Kemotaksija podrazumijeva usmjereno kretanje stanice prema porastu koncentracije neke tvari. Kemoatraktant se veže na receptore na membrani koji posredno utječu na aktivnost GTPaza i time se određuje koji će dio stanice imati vodeću ulogu prilikom kretanja. U vegetativnom stanju amebe se na izgled nasumično kreću po površini u potrazi za hranom. Primijećeno je, međutim, kako njihovo kretanje nije posve nasumično već pokazuje određene obrasce čime se omogućava pretraživanje veće površine u odnosu na način kretanja nasumičnog hodača [13]. Unatoč tome što je *D. discoideum* jednostavan organizam, te amebe posjeduju kompleksnu mrežu regulacije kretanja koja je vrlo slična onoj u stanica sisavaca. Radi jednostavnosti opisat ćemo samo signalizaciju posredovanu proteinima porodice Rho prilikom kemotaksije. Vezanjem cAMPA na receptore s vanjske strane membrane počinje signalna kaskada koja dovodi do biokemijske i morfološke polarizacije stanice s točno određenim prednjim i stražnjim krajem. Nakon vezanja cAMPA koji aktivira heterotrimerične G proteine ubrzo dolazi do aktivacije Rho GTPaza. One posljedično aktiviraju enzim PI3K na prednjem kraju stanice što dovodi do lokalnog nakupljanja fosfoinositida PIP3. Pretpostavlja se kako ovaj mehanizam aktivira i dio RacGEF1 proteina na prednjem i stražnjem kraju stanice. Vezanjem RacGEF1 na F-aktin dolazi do pozitivne povratne veze koja aktivacijom Rac1 stimulira polimerizaciju aktina, čime se nadalje povećava nakupljanje RacGEF1. Paralelno ovim procesima kinaze iz porodice PAK fosforiliraju miozin I i aktiviraju ga, a on u interakciji s drugim proteinima, od kojih smo spomenuli Arp2/3, omogućava elongaciju aktinskih filamenata. Aktivni Rac1 i RacC potiču slične procese putem interakcije sa svojim ciljnim proteinima, od kojih je najvažniji Scar/WAVE iz porodice WASP, koji aktivira Arp2/3. Odgovor stanice na vanjski podražaj stao bi relativno brzo ako u cijeli proces ne bi bili uključeni proteini RhoGDI koji osiguravaju kruženje Rho GTPaza između citoplazme i membrane. Uz svoju ulogu na prednjem kraju stanice, Rac1 je također uključen i u regulaciju stražnjeg kraja. Taj protein interakcijom sa svojim ciljnim proteinima GAPA i DGAP1 aktivira usnopljivače F-aktina kortekstilne i time doprinosi mehaničkim svojstvima staničnog korteksa i omogućuje povlačenje stražnjeg kraja stanice aktivacijom miozina II [12].

1.4 Reakcijsko-difuzijski sustavi u biologiji

Iz prethodnih razmatranja moguće je naslutiti kako su unutarstanični procesi posljedica lokalizacije pojedinih proteina na točno određenim mjestima i njihove međusobne interakcije. Sustave više tvari koje međudjeluju te imaju mogućnost difuzije nazivamo reakcijsko-difuzijskim sustavima. Takav sustav uobičajeno se opisuje skupom nelinearnih parcijalnih diferencijalnih jednadžbi. Svojstvo tih jednadžbi je da njihova rješenja često poprimaju oblik putujućih ili stojnih valova iako su mogući i drugi oblici rješenja. Neki od primjeri bioloških sustava koji se mogu opisati reakcijsko-difuzijskim jednadžbama su: kucanje srca, jednostnevni biološki ritam, periodičko pomicanje ekstremiteta prilikom kretanja, pozicioniranje kromosoma prilikom diobe stanica, te stanično kretanje. Teorijski opis tih sustava često nam, putem usporedbe s eksperimentom, omogućava da prepoznamo ključne čimbenike u nekom procesu, npr. proteine, i da razjasnimo njihove uloge [14]. Reakcijsko-difuzijske sustave u biološkim organizmima prvi je promatrao Alan Turing u svom radu „Kemijske osnove morfogeneze“ iz 1952. godine. Turinga je zanimalo može li se objasniti nastanak pojedinih obrazaca u morfologiji bioloških organizama sustavima jednadžbi koji opisuju međudjelovanje proteina. On navodi kako je sustav kemijskih spojeva koji međudjeluju i difundiraju dovoljan za nastanak obrazaca: „Takav sustav, iako je njegovo početno stanje naizgled homogeno, može tijekom vremenske evolucije razviti obrazac zbog nestabilnosti homogene ravnoteže, koja je perturbirana nasumičnom smetnjom.“ [15]. Uz sam opis jednadžbi sustava, Turing je primijenio i metodu analize stabilnosti kako bi bolje objasnio dinamiku promatranih sustava. Osnovna ideja ovog pristupa je da se svaka mala perturbacija može razviti u Fourierov red. Ako su amplitude male, svaki mod u Fourierovom razvoju raste ili trne eksponencijalno, $\sim \exp(\sigma_q t) \cos(qx)$, ovisno o predznaku realnog djela faktora gušenja σ_q . Analizom stabilnosti moguće je odrediti koji modovi u razvoju trnu a koji rastu u vremenu. Glavni rezultat Turingove analize je da prije spomenute osobine reakcijsko-difuzijskih sustava dovode do pojasa nestabilnih modova kao što je shematski prikazano na slici 1.7. Tek nakon 1970. godine dogodio se sljedeći značajniji pomak u ovom području biofizike kada su Gierer i Meinhardt predložili nekoliko dvokomponentnih modela reakcijsko-difuzijskih sustava te uveli pojmove „aktivator“ i „inhibitor“ [17]. Dva osnovna modela su: „aktivator-inhibitor“ te „aktivator-deplecija“ modeli koji su shematski prikazani na slici 1.7. Prvi pretpostavlja da u sustavu postoje dvije tvari od



Slika 1.7: Shematski prikaz postupka linearne analize (A), modela aktivator-inhibitor (B) i modela aktivator-deplecija (C). Preuzeto iz [16].

kojih aktivator djeluje autokatalitički i sporo difundira, dok inhibitor koči djelovanje aktivatora i brzo difundira. Uz autokatalitičku produkciju aktivator također stvara i inhibitor. Zbog razlike u difuziji aktivator se lokalno nakuplja, a inhibitor se brzo širi i sprječava djelovanje aktivatora na rubu lokalne nakupine. Drugi pristup nazvan aktivator-deplecija pretpostavlja slično uz zamjenu inhibitora za supstrat koji se troši pretvorbom u aktivator. U ovom je slučaju autokatalitička produkcija zamijenjena autokatalitičkom pretvorbom supstrata u aktivator. Gierer i Meinhardt zaključuju kako je nastanak obrazaca zapravo posljedica redistribucije tvari koja stvara gradijente unutar sustava [16]. Bitno je naglasiti kako su ovi model tek matematička idealizacija Turingove ideje te da se pojam tvari u modelu može odnositi i na različite konformacije istog proteina. Veliki broj bioloških procesa posredovan je vezanjem proteina na membranu gdje su konstante difuzije obično dva reda veličine manje od onih u citoplazmi, zbog čega dobivamo dvije populacije tvari različitih brzina difuzije pri čemu citoplazma omogućuje brz transport proteina unutar stanice. Druga karakteristika većine zatvorenih reakcijsko-difuzijskih sustava koji uključuju proteine jest promjena konformacije tih molekula, koja također može biti povezana s tokom tvari na i s membrane. Prvotni modeli aktivator-inhibitor i aktivator-deplecija nisu uzimali u obzir očuvanje ukupnog broja proteina u sustavu. Također, konačni obrasci u koncentraciji mogu ovisiti i o geometriji sustava [16]. Općenito, obrasci koji nastaju u

reakcijsko-difuzijskim sustavima često poprimaju oblik jednog maksimuma za svaku tvar u sustavu, i to neovisno o veličini sustava. Karakterističnu prostornu i vremensku skalu nastalih obrazaca moguće je odrediti jedino numeričkim simulacijama budući da analiza stabilnosti nije precizna daleko od ravnotežnog stanja. Zbog prirodne selekcije, u biološkim sustavima obično očekujemo pojavu robusnih obrazaca koji ne ovise pretjerano o samim parametrima sustava. Nedavna istraživanja su pokazala da vrste obrazaca raspodjele proteina u stanicama mogu ovisiti o odnosu geometrija citoplazme i membrane [18].

1.5 Postojeći modeli dinamike reakcijsko-difuzijskih sustava u staničnom kretanju

Ponudeno je nekoliko modela koji opisuju vegetativno stanično kretanje i kemotaksiju, a zasnovani su na reakcijsko-difuzijskim sustavima. Eksperimentalno je primijećeno kako su pojedini proteini porodice Rho raspoređeni na različitim krajevima stanice. Krećući od ovog opažanja, Jilkine i suradnici su numeričkim simulacijama pokušali odrediti koja od nekoliko predloženih shema interakcije Rho proteina rezultira u prostornom razdvajanju tih proteina na različite krajeve stanice [19]. Testirali su modele primjenjujući idealizirani model stanice gdje je ona predstavljena jednodimenzionalnom dužinom na čijim se krajevima nalazi membrana. Oni zaključuju da već ovako jednostavne simulacije dinamike Rho proteina korištenjem jednodimenzionalnih reakcijsko-difuzijskih sustava mogu razjasniti koja shema interakcija reproducira eksperimentalna opažanja. Provedeno je i općenitije istraživanje u kojem je razmatrano kako različiti tipovi apstraktnih aktivator-deplecija modela s očuvanom masom utječu na stvaranje domena s povišenom koncentracijom Rho GTPaza u staničnoj membrani [20]. Dobiveni rezultati upućuju na to da modeli koji se razlikuju u matematičkoj formulaciji reakcijskih članova mogu rezultirati u ekvivalentnim obrascima, s jednim ili više vrhova, ovisno o jačini početne perturbacije, odnosno o brzini difuzije supstrata. U literaturi je ponudeno nekoliko modela koji direktno pokušavaju objasniti eksperimentalno opažene raspodjele proteina uključenih u regulaciju aktinskog citoskeleta u stanicama *D. discoideum*. Jedan od takvih je tzv. „LEGI-BEN“ model kojega su predložili Shi i suradnici [21]. Njihov se pristup sastoji od dva odvojena dijela. „BEN“ (Biased excitable network) dio od-

nosi se na aktivator-inhibitor model koji predstavlja spontanu dinamiku signalnih proteina, dok dodavanjem „LEGI“ (Local excitation-local inhibition) dijela sustav dobiva mogućnost odgovora na vanjski podražaj u obliku kemoatraktanta. Naknadno su u model dodana dva modula od kojih prvi simulira deformaciju membrane dok drugi uvodi povratne veze između tvari u sustavu i citoskeleta. Numeričke simulacije cjelovitog modela reproducirale su neke od eksperimentalno opaženih značajki vegetativnog kretanja i kemotaksije. Mana ovakvog pristupa je što ne postoji jasna veza komponenata modela s proteinima u stanici. U drugom radu iste grupe [22] autori su pokušali modelirati brzu oscilatornu dinamiku Scar/WAVE, Ras i PI(3)K proteina drugačijim modelom koji nazivaju „STEN-CON“. Dinamiku signalnih proteina opisali su „STEN“ (Signal transduction excitable network) dijelom, a proteine direktno vezane uz regulaciju citoskeleta „CON“ (Cytoskeletal oscillatory network) dijelom. Njihov je model stoga sastavljen od dva povezana aktivator-inhibitor modela koji se odnose na različite populacije proteina. Za razliku od prije spomenutog „LEGI-BEN“ modela, autori su u ovom slučaju predložili direktnu korespondenciju varijabli modela s pojedinim proteinima koji sudjeluju u regulaciji staničnog kretanja. U novijem radu iste grupe [23], autori su odlučili provjeriti mogu li se mijenjanjem određene kritične varijable već spomenutog STEN modula, kojem je dodan modul odgovoran za deformacije membrane, postići različiti migracijski modovi za koje je pretpostavljeno da rezultiraju iz polarnosti raspodjele proteina citoskeleta. Provedene simulacije mogu reproducirati kontinuirani prijelaz između tri karakteristična oblika stanice, koje nazivaju ameboidni, lepezasti i oscilatorni, ovisno o parametrima modela. Autori nadodaju kako je istim modelom moguće postići i kemotaksiju ukoliko bi vanjski utjecaj neravnomjerno promijenio spomenutu ekscitabilnost na prednjem i stražnjem kraju stanice. Mana nekih od gore izloženih pristupa jest kako ne uzimaju u obzir očuvanje broja molekula u svim modelima. Naime, sinteza i degradacija proteina unutar stanice mnogo su sporije nego što su pojave obrazaca u koncentraciji koje dovode do kretanja. Drugim riječima, pojava obrazaca posljedica je preraspodjele tvari, a ne njenog nastajanja i nestajanja [16].

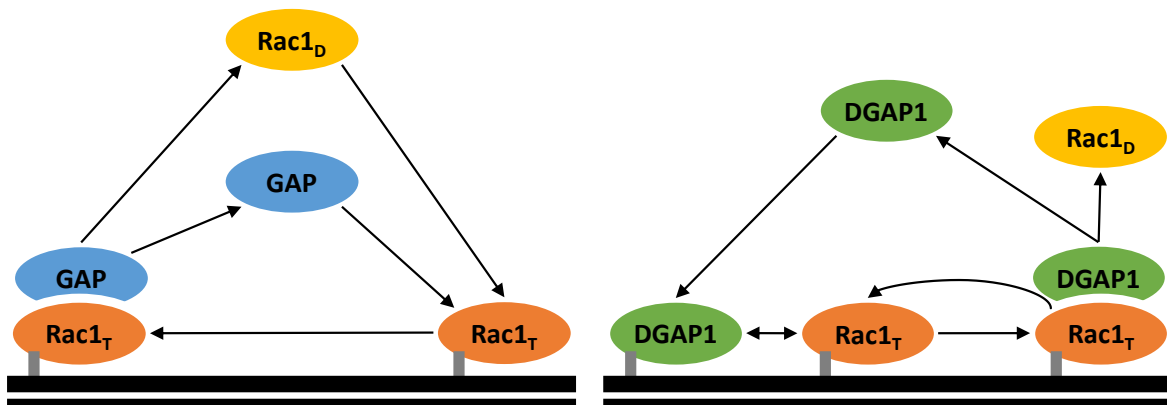
1.6 Motivacija i cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada je opisati dinamiku proteina Rac1 tijekom kretanja vegetativnih stanica organizma *D. discoideum* koristeći reakcijsko-difuzijski model u dvije dimenzije. Poznato je da male GTPaze iz grupe Rac utječu na regulaciju aktinskog citoskeleta u stanicama *D. discoideum* kao i u drugim eukariotskim organizmima. Posebno je važna uloga proteina iz grupe Rac u aktivaciji polimerizacije aktina. Koristeći fluorescentnu probu za aktivni oblik proteina Rac1 [24], konfokalnom mikroskopijom prikupljeni su eksperimentalni podaci koji opisuju vremensko-prostorne obrasce raspodjele tog proteina u živim stanicama *D. discoideum*. Prethodno je dinamika proteina Rac1 opisana jednodimenzionalnim reakcijsko-difuzijskim modelom koji opisuje stanicu kao kružnicu s dva područja, citoplazmom i membranom [25]. Taj je model uspio reproducirati osnovne značajke dinamike aktivne forme proteina Rac1 vezanog na membranu kao što su putujući i stojni valovi, te stabilna polarizacija. Jednodimenzionalni model, međutim, ne uzima u obzir utjecaj oblika stanice na dinamiku proteina. Naime, poznato je da amebe poput *D. discoideum* prilikom kretanja aktivno mijenjaju oblik. Ustanovljena su tri tipična obrasca koja se pojavljuju u izgladnjelim i vegetativnim stanicama: elongacije, rotacije i oscilacije [26], [27]. Uzevši to u obzir, u ovom ćemo radu poopćiti postojeći jednodimenzionalni model na dvije dimenzije i proizvoljnu geometriju, budući da očekujemo kako će oblik sustava utjecati na obrasce u raspodjeli proteina Rac1. Cilj nam je ustanoviti utjecaj oblika stanice na dinamiku proteina Rac1 u modelu i usporediti teorijske rezultate s eksperimentalnim podacima. Za matematičko modeliranje odabrana je metoda konačnih elemenata koja se u prijašnjim radovima pokazala prikladnom za modeliranje reakcijsko-difuzijskih sustava [28], [29], [30]. U sljedećem poglavlju izložen je detaljni teorijski opis našeg modela.

2 Teorijski model

2.1 Model stanične polarizacije

U prijašnjim je istraživanjima ustanovljeno da postoje dvije populacije aktivnog proteina Rac1 na membrani [24]. Prva, pokretna i dinamična frakcija uključena je u regulaciju Arp2/3 kompleksa na membrani koji posreduje u polimerizaciji aktina i stvaranju protružija na prednjem kraju stanice. Druga frakcija aktivnog Rac1 sakuplja se na komplementarnim područjima, odnosno na stražnjem kraju stanice gdje tvori kompleks s efektorom DGAP1. Taj kompleks posreduje u usnopljavanju aktinskih vlakana u stražnjem korteksu putem korteksilina. Reakcijsko-difuzijski model korišten u ovom diplomskom radu sastoji se prema tome od dva dijela, prikazana na slici [16]. Kako bi se smanjio broj slobodnih parametara modela, kao varijable su



Slika 2.1: Shematski prikaz interakcija Rac1, GAP i DGAP1. Oznaka Rac1_D predstavlja neaktivni, citoplazmatski Rac1 na koji je vezan GDP, dok Rac1_T predstavlja aktivni Rac1 na membrani na kojeg je vezan GTP.

eksplicitno uključene samo koncentracije i prostorne distribucije proteina Rac1, GAP i DGAP1. Prvi dio modela (lijevo) opisuje deaktivaciju aktivnog oblika Rac1 GTPaze i njezino otpuštanje s membrane u citoplazmu, proces koji je posredovan vezanjem proteina GAP. Suprotno usmjereni proces, vezanje Rac1 na membranu i njegova aktivacija djelovanjem GEF proteina, svedena je radi jednostavnosti na jedan korak. Uz intrinzičnu stopu vezanja Rac1 na membranu, u model je uključen i član koji se odnosi na pozitivnu povratnu spregu koja lokalno pojačava aktivaciju i vezanje Rac1 proteina na područjima na kojima je Rac1 već nakupljen. Naime, pokazano je kako u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* GTPaza Cdc42, njezin GEF i ciljni protein Bem1 zajedno djeluju kako bi lokalno pojačali aktivaciju Cdc42 proteina [31]. Proces

inaktivacije Rac1 GTPaze putem GAPa i njezino vraćanje u citoplazmu, posredovano GDI proteinima, također su spojeni u jedan korak. Drugi dio modela (desno) opisuje interakciju Rac1 molekula s ciljnim proteinom DGAP1. Uključena su dva nezavisna načina razgradnje Rac1-DGAP1 kompleksa. U prvom slučaju, nakon raspadanja kompleksa aktivni Rac1 ostaje vezan za membranu, dok se DGAP1 vraća u citoplazmu. U drugom se slučaju oba proteina vraćaju u citoplazmu. Spomenute interakcije opisane su pomoću 7 nelinearnih parcijalnih diferencijalnih jednačini:

$$\frac{\partial R_D}{\partial t} = d_R \nabla^2 R_D, \quad (2.1)$$

$$\frac{\partial G}{\partial t} = d_G \nabla^2 G, \quad (2.2)$$

$$\frac{\partial D}{\partial t} = d_D \nabla^2 D, \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial R_T}{\partial t} = k_5 D_k - k_2 R_T G - k_4 R_T D_m + R_D M_R (k_1 + k_{11} R_T + k_{12} G_k), \quad (2.4)$$

$$\frac{\partial G_k}{\partial t} = k_2 R_T G - k_3 G_k, \quad (2.5)$$

$$\frac{\partial D_m}{\partial t} = M_D k_6 D - k_4 R_T D_m, \quad (2.6)$$

$$\frac{\partial D_k}{\partial t} = k_4 R_T D_m - (k_5 + k_{51}) D_k, \quad (2.7)$$

R_D , G i D označavaju koncentracije Rac1-GDP, GAP i DGAP1 u citoplazmi, dok se R_T , D_m , G_k te D_k odnose na koncentracije Rac1-GTP, DGAP1, Rac1-GAP kompleksa i Rac1-DGAP1 kompleksa na membrani. U jednačini, M_R i M_D označava koncentracije slobodnih vezivnih mjesta za Rac1 i DGAP1 respektivno na membrani definiranih izrazima:

$$M_R = (R_T^{max} - R_T), \quad M_D = (D_m^{max} - D_m). \quad (2.8)$$

Stanica je modelirana kao dvodimenzionalni sustav gdje površina predstavlja citoplazmu, dok rub površine predstavlja membranu. Budući da su koeficijenti difuzije dva reda veličine veći u citoplazmi nego u membrani u jednadžbama koje opisuju membranske populacije tvari izostavljen je difuzijski član. Varijable koje opisuju proteine vezane za membranu zadovoljavaju periodički rubni uvjet dok je rubni uvjet za citoplazmatske varijable dan tokom na membranu:

$$d_R \frac{\partial R_D}{\partial n} = J_R = k_3 G_k - R_D M_R (k_1 + k_{11} R_T + k_{12} G_k) + k_{51} D_k , \quad (2.9)$$

$$d_G \frac{\partial G}{\partial n} = J_G = k_3 G_k - k_2 R_T G , \quad (2.10)$$

$$d_D \frac{\partial D}{\partial n} = J_D = -M_D k_6 D + (k_5 + k_{51}) D_k , \quad (2.11)$$

Gornji sustav jednadžbi zadovoljava zakon očuvanja pojedine vrste tvari što se može izraziti:

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{\Omega} (R_D + R_T + G_k + D_k) d\Omega = 0 , \quad (2.12)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{\Omega} (G_k + G) d\Omega = 0 , \quad (2.13)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{\Omega} (D_k + D_m + D) d\Omega = 0 , \quad (2.14)$$

gdje je Ω domena na kojoj je zadan sustav jednadžbi 2.1-2.7.

2.2 *Pristupi modeliranju reakcijsko-difuzijskih sustava*

Reakcijsko-difuzijske jednadžbe karakteriziramo kao semilinearne parcijalne diferencijalne jednadžbe. To znači da se parcijalne derivacije funkcije u , čije rješenje tražimo, pojavljuju linearno, ali ne nužno i sama funkcija. Egzaktno analitičko rješavanje tih jednadžbi često nije moguće stoga se obično koriste aproksimativne numeričke metode. Postoji više pristupa ovisno o dimenziji problema koji pokušavamo riješiti i preciznosti koju želimo postići od kojih su najčešće: metoda konačnih razlika (FDM) i metoda konačnih elemenata (FEM). Obje metode koriste diskretizaciju domene kako bi pojednostavile početni problem. U FDM derivacije funkcije po prostornim koor-

dinatama mijenjamo s konačnim omjerima razlika između dva susjedna segmenta. Odnosno diskretiziramo posebno svaku od dimenzija koje opisuju problem. S druge strane u FEM diskretiziramo prostor na manje segmente čiji rubovi nisu nužno paralelni s jediničnim vektorima pojedine koordinate. Na primjer, u FDM možemo kružnu domenu podijeliti tako da ju rastavimo na zakrivljene elemente gdje su dvije stranice kružni lukovi koaksijalni s kružnicom, a druge dvije stranice okomite na te lukove i paralelne s jediničnim vektorom u radijalnom smjeru. Ako koristimo FEM možemo kružnu domenu popuniti otprilike jednakim trokutima (ili drugim geometrijskim oblicima) čije stranice nisu korelirane s jediničnim vektorima. Glavna razlika ove dvije metode proizlazi upravo iz načina diskretizacije domene. Budući da u FEM metodi računamo sustav na svakom od elemenata na koji smo podijelili domenu, dobivamo kontinuirano rješenje na cijeloj domeni, čija preciznost ovisi o načinu aproksimacije vrijednosti funkcija u svakom od elemenata. Suprotno tome, ako koristimo FDM dobivamo rješenje samo u čvorovima koje smo postavili na domeni, a kontinuirano rješenje moguće je dobiti jedino interpolacijom vrijednosti u čvorovima. Bitno je spomenuti kako zbog gornjih razloga FDM obično zahtjeva kraće vrijeme računanja nego FEM, no ujedno je ta metoda limitirana na aproksimaciju u prvom redu, dok FEM omogućava proizvoljni red aproksimacije prilikom računanja.

2.3 Matematički formalizam metode konačnih elemenata

Radi jednostavnosti promotrit ćemo matematički formalizam metode konačnih elemenata na primjeru jedne parcijalne nelinearne parabolične diferencijalne jednadžbe. Općeniti postupak formulacije zadanog problema je sljedeći: najprije zapišemo dani sustav jednadžbi u slaboj formulaciji nakon čega diskretiziramo problem u prostoru te ako je potrebno i u vremenu. Diskretizacija problema u vremenu neće biti opisana u ovom diplomskom radu. Za detaljniji i rigorozniji raspis matematičkog formalizma koji uključuje izvod odstupanja aproksimacije od pravog rješenja kao i za raspis diskretizacije u vremenu čitatelja se upućuje na literaturu [32]. Neka je Ω planarna konveksna domena na \mathbb{R}^d s glatkim rubom $\partial\Omega$. Zadana je nelinearna parabolična

parcijalna diferencijalna jednadžba:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} - \vec{\nabla} \cdot (a(u) \vec{\nabla} u) &= f(u), & \text{na } \Omega, t \geq 0, \\ u &= 0, & \text{na } \partial\Omega, t \geq 0, \end{aligned} \quad (2.15)$$

s početnim uvjetom:

$$u(\cdot, t) = v, \quad \text{na } \Omega. \quad (2.16)$$

U gornjem su problemu a i f glatke funkcije definirane na polju \mathbb{R} tako da vrijedi:

$$0 < \mu < a(u) \leq M, \quad |a'(u)| + |f'(u)| \leq B, \quad \text{za } u \in \mathbb{R}, \quad (2.17)$$

gdje smo s' označili vremensku derivaciju funkcije, a s μ , M i B neke konstante. Pretpostavljamo kako gornji problem ima jedinstveno rješenje koje je dovoljno glatko za naše svrhe. Neka je \mathcal{T}_h član familije kvaziuniformne triangulacije na Ω s $\max_{\tau \in \mathcal{T}_h} \text{diam } \tau \leq h$, (*diam* se u našem slučaju odnosi na stranicu trokuta) te neka je S_h pripadni konačnodimenzionalni prostor kontinuiranih funkcija na Ω koje se reduciraju na linearne funkcije u svakom od trokuta \mathcal{T}_h i jednake su 0 na $\partial\Omega$. Drugim riječima \mathcal{T}_h označava podjelu Ω na disjunktne trokute τ takve da niti jedan vrh nekog trokuta ne leži u unutrašnjosti drugog. Uz to unija svih trokuta određuje poligonalnu domenu $\Omega_h \subset \Omega$ s graničnim vrhovima na $\partial\Omega$. Konstanta h predstavlja gornju među stranice nekog trokuta τ , što povlači da smanjenje tog parametra čini mrežu finijom. Kvaziuniformna triangulacija spomenuta prije znači da su svi trokuti otprilike iste veličine, što možemo postići ako zahtijevamo da je površina trokuta omeđena od dolje s ch^2 , gdje je c pozitivna konstanta neovisna o h . Vratimo se spomenutom Sobolevljevom prostoru funkcija S_h . Neka su $\{P_j\}_{j=1}^{N_h}$ unutrašnji vrhovi \mathcal{T}_h . Funkcija $u \in S_h$ je jednoznačno određena s vrijednostima u P_j i time ovisi o N_h parametara. Uzmimo da je Φ_j piramidalna funkcija u S_h koja poprima vrijednost 1 u P_j i 0 u ostalima vrhovima. Tada $\{\Phi_j\}_{j=1}^{N_h}$ tvori bazu od S_h i svaku funkciju $\chi \in S_h$ možemo zapisati na način:

$$\chi(x) = \sum_{j=1}^{N_h} \alpha_j \Phi_j(x), \quad \text{uz } \alpha_j = \chi(P_j). \quad (2.18)$$

Proizvoljnu funkciju v na Ω koja je jednaka 0 na $\partial\Omega$ sada možemo aproksimirati njezinom interpolacijom $I_h v$ na S_h , koju definiramo kao funkciju na S_h koja se slaže

s v u svakom od vrhova \mathcal{T}_h .

$$I_h v(x) = \sum_{j=1}^{N_h} v(P_j) \Phi_j(x) . \quad (2.19)$$

Vratimo se sada početnom problemu (2.15). Kako bi primijenili metodu konačnih elemenata, kao što je već spomenuto, najprije moramo zapisati zadani problem u slaboj formulaciji. Odnosno, pomnožiti jednadžbu s glatkom funkcijom ϕ koja iščezava na $\partial\Omega$, (Zahtijevamo $\phi \in H_0^1$, što znači da funkcija ϕ i njezine slabe parcijalne derivacije pripadaju L^2 na Ω te da su 0 na rubu $\partial\Omega$.) integriramo po Ω i primjenjujemo Greenov identitet.

$$\phi \frac{\partial u}{\partial t} - \phi \vec{\nabla} (a(u) \vec{\nabla} u) = \phi f(u) , \quad (2.20)$$

$$\int_{\Omega} \phi \frac{\partial u}{\partial t} d\Omega - \int_{\Omega} \phi \vec{\nabla} (a(u) \vec{\nabla} u) d\Omega = \int_{\Omega} \phi f(u) d\Omega , \quad (2.21)$$

$$\int_{\Omega} \phi \frac{\partial u}{\partial t} d\Omega - \int_{\partial\Omega} \phi a(u) \vec{\nabla} u d(\partial\Omega) + \int_{\Omega} (\vec{\nabla} \phi) (a(u) \vec{\nabla} u) d\Omega = \int_{\Omega} \phi f(u) d\Omega . \quad (2.22)$$

Funkciju $u \in H_0^1$ koja zadovoljava gornju jednadžbu (2.22) nazivamo varijacijskim rješenjem problema (2.15). Sada smo spremni postaviti semidiskretnu formulaciju (diskretizirana u prostoru ali ne i u vremenu) problema (2.15). Tražimo $u_h : t \geq 0 \rightarrow S_h$ takav da vrijedi:

$$\begin{aligned} \int_{\Omega} \phi \frac{\partial u_h}{\partial t} d\Omega + \int_{\Omega} (a(u_h) \nabla u_h) (\nabla \phi) d\Omega &= \int_{\Omega} \phi f(u_h) d\Omega , \quad \forall \phi \in S_h, t \geq 0 , \\ u_h(0) &= v_h , \end{aligned} \quad (2.23)$$

gdje smo s v_h označili aproksimaciju funkcije v na S_h . Rješenje u_h možemo zapisati kao:

$$u_h(x, t) = \sum_{j=1}^{N_h} \alpha_j(t) \Phi_j(x), \quad (2.24)$$

gdje je $\{\Phi_j\}_{j=1}^{N_h}$, kao što je već spomenuto, baza piramidalnih funkcija. Gornji problem (2.23) sada možemo zapisati na način:

$$\begin{aligned} \sum_{j=1}^{N_h} \frac{\partial \alpha_j}{\partial t} \int_{\Omega} \Phi_j \Phi_k d\Omega + \sum_{j=1}^{N_h} \alpha_j(t) \int_{\Omega} \left(a \left(\sum_{l=1}^{N_h} \alpha_l(t) \Phi_l \right) \nabla \Phi_j \right) (\nabla \Phi_k) d\Omega \\ = \int_{\Omega} f \left(\sum_{l=1}^{N_h} \alpha_l(t) \Phi_l \right) \Phi_k d\Omega , \quad k = 1, \dots, N_h . \end{aligned} \quad (2.25)$$

Budući da imamo slobodu izbora, biramo najjednostavniji slučaj:

$$\phi(x) = \sum_{j=1}^{N_h} \Phi_j(x) . \quad (2.26)$$

Radi preglednosti zapisat ćemo dobiveni sustav (2.25) u matričnom obliku. Biramo $\vec{\alpha} = \vec{\alpha}(t) = (\alpha_1(t), \dots, \alpha_{N_h}(t))^T$ i uvodimo matrice $\mathcal{B} = (b_{jk})$ i $\mathcal{A} = (a_{jk}(\alpha))$ s elementima:

$$b_{jk} = \int_{\Omega} \Phi_j \Phi_k d\Omega \quad \text{i} \quad a_{jk} = \int_{\Omega} \left(a \left(\sum_{l=1}^{N_h} \alpha_l(t) \Phi_l \right) \nabla \Phi_j \right) \left(\nabla \Phi_k \right) d\Omega$$

te vektor $\vec{f}(\vec{\alpha}) = (f_1(\vec{\alpha}), \dots, f_{N_h}(\vec{\alpha}))^T$, uz

$$f_j(\vec{\alpha}) = \int_{\Omega} f \left(\sum_{l=1}^{N_h} \alpha_l \Phi_l \right) d\Omega .$$

Sve zajedno sada možemo zapisati na način:

$$\mathcal{B} \frac{\partial \alpha_j}{\partial t} + \mathcal{A}(\vec{\alpha}) \alpha = \vec{f}(\vec{\alpha}), \quad \text{za } t \geq 0, \text{ uz } \vec{\alpha}(0) = \vec{\gamma}, \quad (2.27)$$

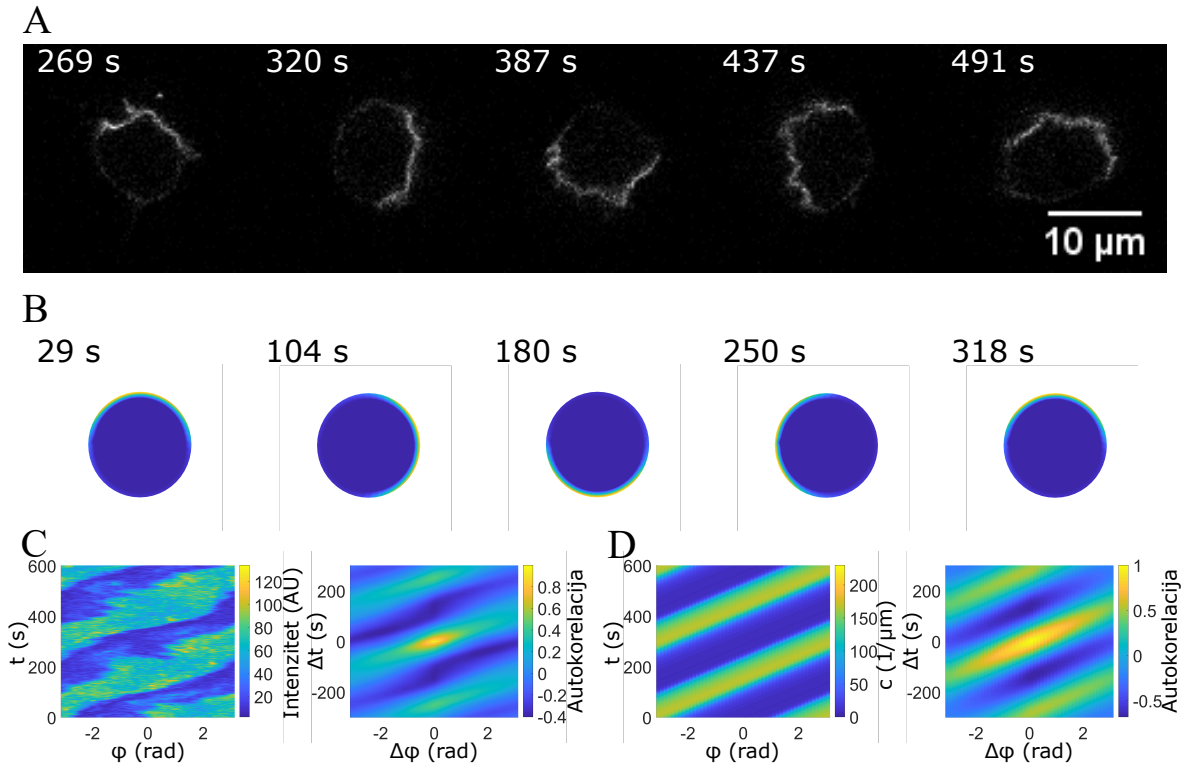
gdje je γ vektor vrijednosti u vrhovima triangulacije \mathcal{T}_h funkcije v . Zbog pretpostavke (2.17) matrice \mathcal{B} i $\mathcal{A}(\alpha)$ su pozitivno definitne, dok su $\mathcal{A}(\alpha)$ i $\vec{f}(\alpha)$ globalno Lipschitz kontinuirane na \mathbb{R}^{N_h} . Slijedi kako sustav ima jedinstveno rješenje za $t \geq 0$ koje je omeđeno. Rješavanje zadanog problema svodi se na određivanje matrica \mathcal{B} i $\mathcal{A}(\alpha)$ te vektora $\vec{f}(\alpha)$ i rješavanje dobivenog sustava diferencijalnih jednadžbi. U dodatku D izložen je konkretan primjer postavljanja i rješavanja reakcijsko-difuzijskog sustava upravo uvedenom metodom konačnih elemenata.

3 Rezultati i diskusija

3.1 Usporedba eksperimentalnih rezultata i numeričkih simulacija

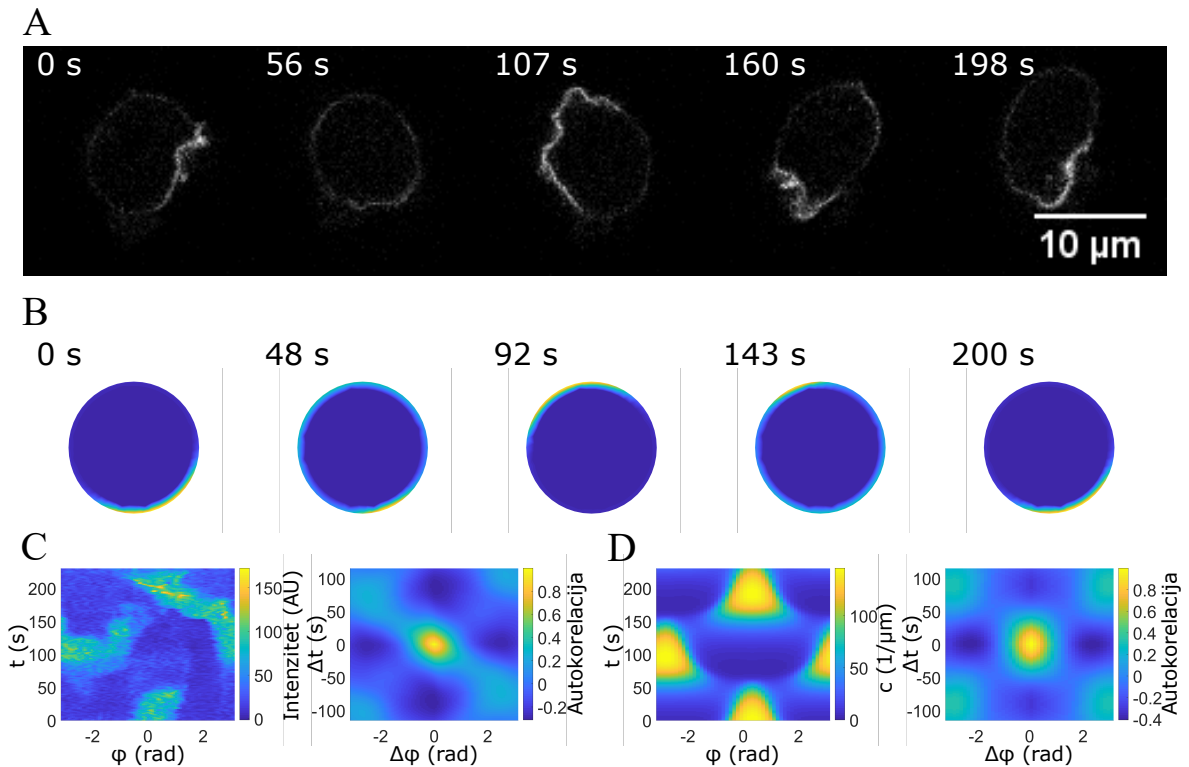
Motivirani prijašnjim radovima [25], [26], [27], odlučili smo konfokalnom fluorescencijskom mikroskopijom snimati amebe *D. discoideum* u vegetativnom stadiju koje eksprimiraju fluorescentnu probu za aktivni Rac1 i dobivene obrasce u raspodjeli aktivne forme Rac1 usporediti s rezultatima modela. Već je ranije primijećeno kako kretanje stanica *D. discoideum* po površini nije posve nasumično. Killich i suradnici zaključili su da određen dio stanica u vegetativnom stadiju pokazuje pri kretanju obrasce nalik na rotacije i oscilacije [27]. Prilikom rotacija izbočenja na membrani naizgled kruže oko centra stanice kao putujući val, dok pri oscilacijama izbočenja nastaju i nestaju na suprotnim krajevima stanice (stojni val). Autori navode kako se elongacija membrane može opisati jednostavnim trigonometrijskim funkcijama koje ovise o položaju na rubu stanice i vremenu. Kasnije je provedeno i općenitije istraživanje čiji je cilj bio još detaljnije okarakterizirati obrasce u promjeni oblika prilikom spontanog kretanja ameba *D. discoideum* [26]. U tom radu Maeda i suradnici također su pratili udaljenost ruba od centra stanice, te osim spomenutih obrazaca opisali i jedan novi koji ćemo nazvati polarnim stanjem. Polarno stanje karakterizira veća elongacija prednjeg i manja elongacija stražnjeg kraja stanice, što vodi k pretežno usmjerenom gibanju stanice. Kao što će se vidjeti u nastavku, obrasci aktivnog Rac1 bili su nalik na obrasce koji su u spomenutim radovima opisani za oblik neobilježenih stanica. U sklopu ovog diplomskog rada snimljeno je i metodama digitalne obrade slika analizirano kretanje otprilike 70 stanica u trajanju od 400 do 850 sekundi. Nakon analize snimki izdvojene su 32 stanice u kojima je dinamika aktivnog Rac1 odgovarala navedenim obrascima. Postupci snimanja i analize slika podrobnije su opisani u dodatcima A i B. U prethodnim istraživanjima, jednodimenzionalne simulacije opisanog reakcijsko-difuzijskog modela mogle su uspješno reproducirati eksperimentalno utvrđene obrasce rotacije, oscilacije i polarne distribucije aktivnog Rac1 [25]. Stoga smo u prvom koraku odlučili provjeriti može li isti model formuliran u dvije dimenzije dati iste rezultate. Kao osnovna geometrija modela odabrana je kružnica budući da jednodimenzionalni model posjeduje istu simetriju. Sistematskim

pretraživanjem parametarskog prostora sustava jednadžbi 2.1-2.7 uspješno su reproducirane eksperimentalno opažene oscilacije, rotacije i polarna stanja. Rezultati ovog dvodimenzionalnog modela također se veoma dobro poklapaju i s rezultatima simulacija jednodimenzionalnog modela. Detalji postupka numeričkih simulacija dani su u dodatku C. Prije ispitivanja utjecaja oblika stanice na dinamiku proteina Rac1 u



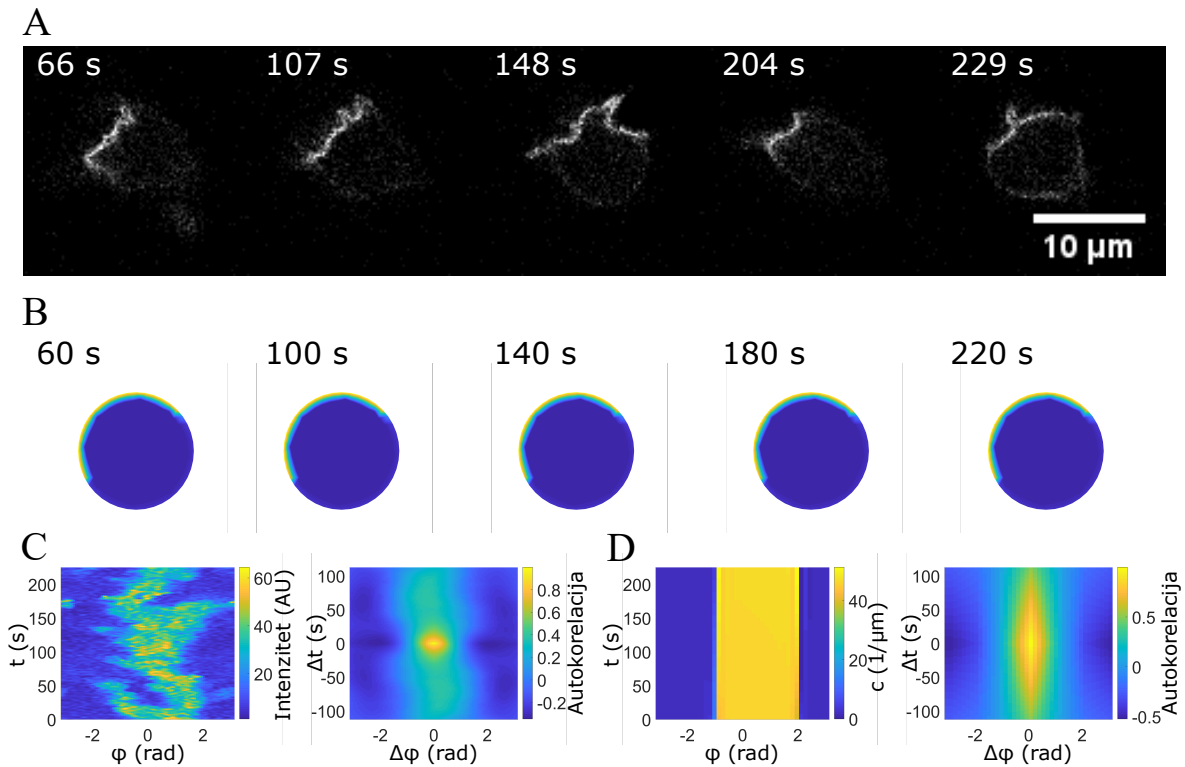
Slika 3.1: Rotacija. Usporedba eksperimentalno izmjerene dinamike aktivne forme proteina Rac1 na membrani i numeričkih simulacija dvodimenzionalnog modela. Isječci eksperimentalne snimke (A) i numeričke simulacije (B). (C) Kimograf intenziteta fluorescencije probe na membrani (lijevo) i odgovarajuća autokorelacijska funkcija (desno). (D) Kimograf koncentracije aktivnog Rac1 na membrani u modelu (lijevo) i odgovarajuća autokorelacijska funkcija (desno).

našem modelu, prikazati ćemo usporedbu eksperimentalnih rezultata s rezultatima numeričkih simulacija dvodimenzionalnog modela (slike 3.1, 3.2 i 3.3). Na slikama su prikazani isječci eksperimentalnih snimki i rezultata simulacija te kimografi koncentracije aktivnog oblika Rac1 u membrani koji prikazuju ovisnost koncentracije o radijalnom položaju na membrani i vremenu. Zbog šuma koji se pojavljuje u eksperimentalnim snimkama, uz kimografe su prikazane i izračunate autokorelacijske funkcije intenziteta fluorescencije. Usporedbom autokorelacijskih funkcija eksperimentalnih rezultata i numeričkih simulacija mnogo je lakše usporediti eksperimentalno i teorijski dobivene obrasce. Na slici 3.1 prikazana je rotacija čiju dinamiku karakterizira



Slika 3.2: Oscilacija. Usporedba eksperimentalno izmjerene dinamike aktivne forme proteina Rac1 na membrani i numeričkih simulacija dvodimenzionalnog modela. Isječci eksperimentalne snimke (A) i numeričke simulacije (B). (C) Kimograf intenziteta fluorescencije probe na membrani (lijevo) i odgovarajuća autokorelacijska funkcija (desno). (D) Kimograf koncentracije aktivnog Rac1 na membrani u modelu (lijevo) i odgovarajuća autokorelacijska funkcija (desno).

kretanje maksimuma koncentracije aktivnog Rac1 po membrani približno stalnom brzinom u obliku putujućeg vala. Možemo primijetiti kako model reproducira period rotacije gotovo jednak onom izmjenom u eksperimentu. U slučaju oscilacija, maksimum u koncentraciji aktivnog Rac1 seli se s jednog kraja membrane na drugi kao što je prikazano na slici 3.2. Na kimografu koji prikazuje eksperimentalno izmjerenu dinamiku fluorescencijskog signala možemo primijetiti kako obrazac između 140. i 190. sekunde posjeduje karakteristiku rotacije, no usporedbom autokorelacijskih funkcija vidi se da u obrascu u cjelini pretežu oscilacije (usporediti slike 3.2 C i D sa slikama 3.1 C i D). Zadnji obrazac koji smo uočili prikazan je na slici 3.3 i odgovara polarnom stanju. Područje povišene koncentracije aktivne forma Rac1 ostaje na istom mjestu na membrani više od 3.5 minuta. Zaključujemo kako dvodimenzionalni model sustava riješen metodom konačnih elemenata može reproducirati tri tipična obrasca u raspodjeli aktivnog oblika Rac1 u membrani (jednadžbe 2.1-2.1). Spomenimo kako parametri korišteni prilikom simulacija jednodimenzionalnog i dvodimenzionalnog

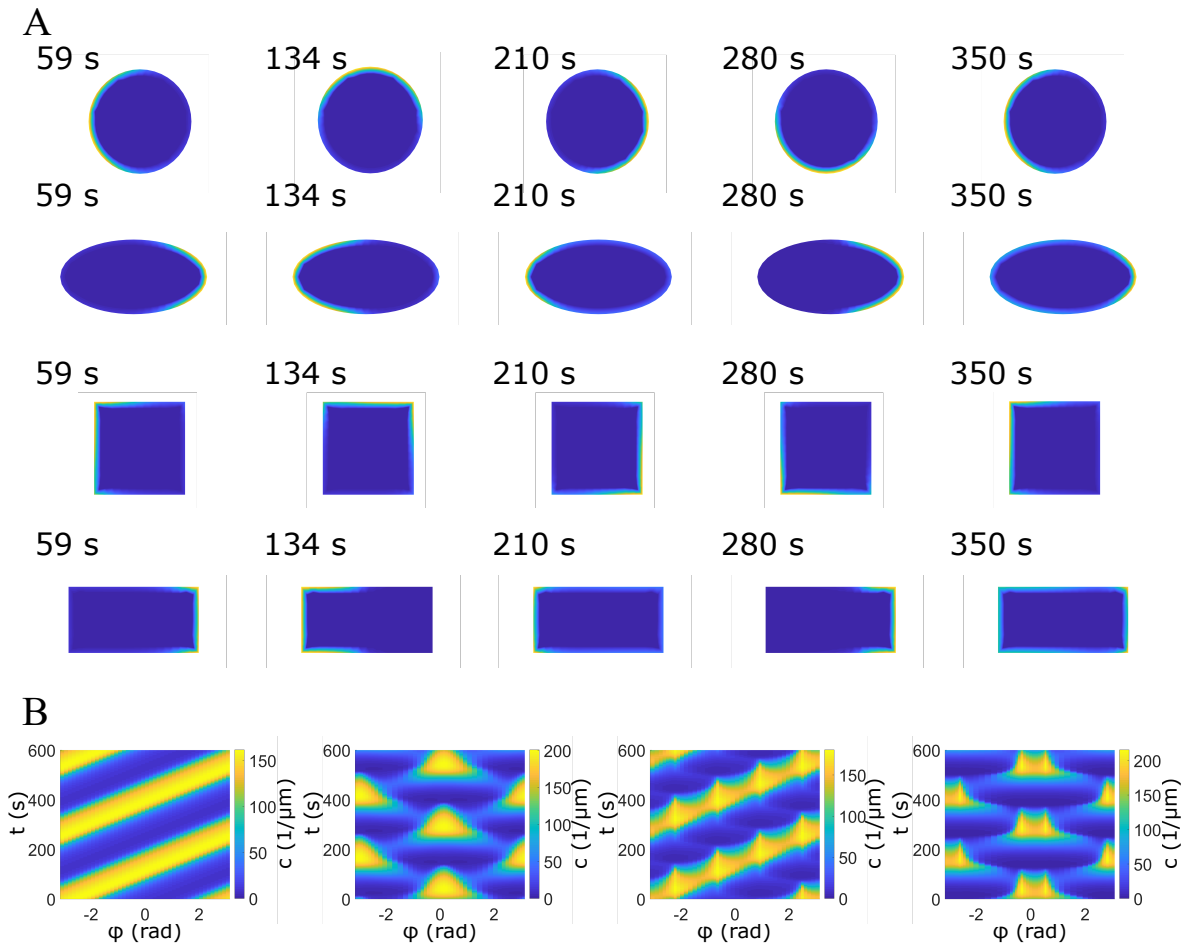


Slika 3.3: Monopolarno stanje. Usporedba eksperimentalno izmjerene dinamike aktivne forme proteina Rac1 na membrani i numeričkih simulacija dvodimenzionalnog modela. Isječci eksperimentalne snimke (A) i numeričke simulacije (B). (C) Kimograf intenziteta fluorescencije probe na membrani (lijevo) i odgovarajuća autokorelacijska funkcija (desno). (D) Kimograf koncentracije aktivnog Rac1 na membrani u modelu (lijevo) i odgovarajuća autokorelacijska funkcija (desno).

modela nemaju iste vrijednosti. Nakon što su uspješno reproducirani pojedini obrasci u numeričkim simulacijama odlučili smo ispitati ovisnost dinamike aktivnog proteina Rac1 o geometriji, tj. o obliku stanica.

3.2 Ovisnost dinamike aktivne forme Rac1 o geometriji sustava

Stanice organizma *D. discoideum* prilikom kretanja znatno mijenjaju svoj oblik. Također, poznato je da obrazac raspodjele komponenti koji nastaje u reakcijsko-difuzijskim sustavima može ovisiti o njihovoj geometriji. Takvu ovisnost očekujemo i u našem modelu iz sljedećih razloga. Izduljivanjem oblika, difuzija na užem dijelu geometrije mnogo brže smanjuje gradijent koncentracije nego na širem dijelu. K tome, udaljavanjem dva nasuprotna dijela membrane difuzija proteina s jedne strane na drugu zahtijeva više vremena. Kako bi ispitali posljedice ove pretpostavke odlučili smo simulirati sustav s parametrima koji na kružnoj geometriji kao rješenje daju rotacije. Radi jednostavnosti naše simulacije, ograničili smo na tri nove geometrije:



Slika 3.4: Usporedba rezultata računalnih simulacija modela za različite oblike geometrije. (A) Isječci numeričke simulacije za redom (od gore prema dolje) krug, elipsu, kvadrat i pravokutnik. (B) Kimografi koncentracije aktivnog Rac1 na membrani u modelu za, s lijeva na desno, krug, elipsu, kvadrat i pravokutnik.

elipsu, kvadrat i pravokutnik. Razlog odabira elipse je što stanice najbolje možemo aproksimirati upravo tim jednostavnim oblikom, dok smo kvadrat i pravokutnik izabrali kako bi ispitali utjecaj oštih kutova. Svi geometrijski oblici u simulacijama imali su jednaku površinu kao kružnica opsega $35 \mu\text{m}$, dok su omjeri poluosi elipse odnosno stranica pravokutnika bili jednaki 2. Isječci na kojima je prikazana koncentracija aktivne forme Rac1 kao i pripadni kimografi prikazani su na slici 3.4. Rezultati simulacija ukazuju na to kako izduljivanjem geometrije obrazac rotacije prelazi u obrazac oscilacije. Primijećeno je kako granični omjer poluosi elipse na kojem se javlja promjena obrasca ovisi o površini sustava i otprilike iznosi 1.7. Također možemo primijetiti kako oštri kutovi u vrhovima kvadrata i pravokutnika ne mijenjaju glavnu karakteristiku obrasca, iako koncentracija aktivnog Rac1 na membrani ostaje povećana na tim mjestima duže vrijeme nego kod zaobljenih geometrija. U svim se provedenim simulacijama prilikom prelaska iz rotacija u oscilacije, oscila-

cije javljaju uzduž duže osi elipse odnosno pravokutnika. Ujedno, period rotacija na krugu i kvadratu te oscilacija na elipsi i pravokutniku je gotovo jednak kao što se vidi na slici 3.4. Iz dobivenih rezultata zaključujemo kako dinamika proteina u našem modelu znatno ovisi o geometriji. Također ovakvi rezultati mogli bi biti povezani s eksperimentalnim opažanjem da su izgladnjele stanice *D. discoideum* češće duguljastog, a vegetativne češće kružnog oblika [33]. Za kraj spomenimo kako promjena geometrije u svim provedenim simulacijama s parametrima za monopolarno stanje nije utjecala na promjenu obrasca.

4 Zaključak

U ovom je diplomskom radu izložena biološka osnova staničnog kretanja, a zatim je dio signalnog puta Rac1 GTPaze u amebi *Dictyostelium discoideum* modeliran reakcijsko-difuzijskim sustavom koji je riješen metodom konačnih elemenata u dvije dimenzije. Pokazano je kako je metoda konačnih elemenata primjenjiva na reakcijsko-difuzijske sustave u biologiji te da nam omogućava rješavanje istih na proizvoljnoj geometriji. Poopćenjem jednodimenzionalnog modela na dvije dimenzije uočeno je da u našem modelu geometrija igra važnu ulogu u nastanku obrazaca u raspodjeli tvari. U budućnosti namjeravamo istražiti postoji li ovakva ovisnost o geometriji i u živim stanicama. U tu svrhu potrebno je dodatno klasificirati oblik stanica što nije napravljeno u sklopu ovog diplomskog rada. Također bismo željeli proučiti usporavanje vala u koncentraciji na užim mjestima u geometriji koja je primijećena na kutovima kvadrata i pravokutnika prilikom simulacije modela. Uz spomenuti smjer nastavka istraživanja bilo bi korisno sistematski pretražiti parametarski prostor te provjeriti postoji li veza parametara u sustavu jednadžbi koji definira naš model i geometrije. Unatoč tome što ovdje nisu ponuđeni konkretni eksperimentalni rezultati koji bi potkrijepili ovisnost dinamike proteina o geometrijskom obliku sustava, opisan je matematički formalizam metode konačnih elemenata i izložen postupak primjene ove metode u biološkim sustavima koji može poslužiti u budućim radovima.

Dodaci

Dodatak A Snimanje stanica

Za potrebe ovog diplomskog rada amebe *Dictyostelium discoideum* snimane su konfokalnim pretražnim mikroskopom. Kako je aktivni oblik Rac1 odgovoran za promjene stanja aktinskog citoskeleta koji određuje oblik stanice, za određivanje njegove dinamike korištene su stanice divljeg tipa soja AX2 koje su proizvodile fluorescentno obilježenu sondu koja se veže specifično za aktivni oblik spomenutog proteina. Prethodno je pokazano kako ova proba omogućava kvantitativno praćenje Rac1 te njegovu aktivnost [34]. Postupak proizvodnje fluorescentno obilježene probe također je opisan prethodno [24]. Mikroskopija živih stanica provedena je na mikroskopu Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems) na temperaturi 22°, u malim posudicama na staklenoj podlozi. Stanice su isprane u fosfatnom puferu 30 minuta prije snimanja. Valne duljine za pobuđivanje i detekciju bile su: 514 nm i 525–565 nm. Kvantitativna analiza fluorescentnih signala napravljena je u programu ImageJ [35] [36] koristeći modul QuimP [37]. Sve su vremenske serije bile duljine 230 – 500 snimaka koje su bile međusobno razmaknute za 1.72 s.

Dodatak B Analiza snimaka

Snimke fluorescentno obilježenih stanica dobivene konfokalnom mikroskopijom obrađene su u programu ImageJ [35], [36] s modulom QuimP [37]. Najprije je na svaku odabranu stanicu prilagođena kontura membrane nakon čega je pomoću spomenutog programa izvršena analiza svjetline. Program samostalno određuje broj točaka potrebnih za analizu koji može biti vremenski ovisan, a iznosi otprilike 200 točaka. Tako obrađeni podaci jedan na jedan odgovaraju intenzitetu fluorescencije proteina u stanicama koji je proporcionalan njegovoj koncentraciji na nekom području. Program ujedno povezuje i točke s jedne slike u vremenskoj seriji s točkama u sljedećoj slici, tako da je moguće pratiti vremensku ovisnost koncentracije na točno određenom dijelu membrane. Obrađeni podaci nakon toga su učitani s programom za matematičku analizu MATLAB. Budući da broj točaka, kao i duljina membrane, variraju s vremenom, potrebno je prilagoditi učitane podatke za prikaz na kimografima. Za svaku se snimku stanice najprije odredila prosječna duljina membrane. Zatim su se na linearni prostor te duljine interpolirali podaci snimke za svaku sliku posebno koristeći ugrađenu MATLABovu funkciju *csaps*. U sljedećem koraku odredila se autokorelacijska funkcija obrađenih podataka prema formuli:

$$C_{I_{Rac1}, I_{Rac1}}(\Delta x, \Delta t) = \frac{\langle \overline{I_{Rac1}}(x + \Delta x, t + \Delta t) \cdot \overline{I_{Rac1}}(x, t) \rangle_{x,t}}{\langle \overline{I_{Rac1}}^2(x, t) \rangle_{x,t}}, \quad (\text{B.1})$$

gdje se $I(Rac1)$ odnosi na intenzitet signala fluorescencije. Usporedbom autokorelacijske funkcije eksperimentalnih podataka s autokorelacijskom funkcijom podataka simulacija moguće je mnogo lakše razlučiti između pojedinih obrazaca koji inače mogu biti prekriveni šumom.

Dodatak C Numeričke simulacije

Kao početni uvjet u simulaciji zadane su samo koncentracije tvari koje se nalaze u citoplazmi (R_T , G i D), dok su koncentracije ostalih tvari bile jednake nuli. Na homogenu raspodjelu varijabli R_T , G i D superponirana je Gaussova raspodjela relativne amplitude jednake 0.03 u odnosu na homogenu raspodjelu, čiji je vrh izmaknut iz središta. Napomenimo kako se pojedini maksimumi u početnoj koncentraciji zadanih veličina nisu poklapali već su bili razdvojeni na različite strane u odnosu na središte. Tako zadane početne koncentracije normirane su na način da se u sustavu nalazi cijeli broj molekula pojedinog proteina. Vrijeme simulacija bilo je postavljeno na 5000 s , a svi obrasci pojavili su se unutar 500 s . Na slikama 3.1, 3.2 i 3.3 prikazani su segmenti jednake duljine kao i eksperimentalna snimka, dok početni trenutak ($t = 0$ s) na slici odgovara vremenu simulacije $t = 2500$ s . Vrijednosti konstanti modela korištenih u simulacijama nalaze se u tablici C.1.

	rotacija (slika 3.1)	oscilacija (slika 3.2)	monopolarno stanje (slika 3.3)	različite geometrije (slika 3.4)
k_1	$2.7 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2.7 \cdot 10^{-4}$
k_2	1.5	1.5	1.6	1.5
k_3	0.185	0.185	0.13	0.185
k_{11}	$3.7 \cdot 10^{-5}$	$3.7 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$3.7 \cdot 10^{-5}$
k_{12}	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
k_4	0.06	0.06	0.1	0.06
k_5	2.15	2.15	3.3	2.15
k_6	0.5	0.5	0.14	0.5
k_{51}	0.135	0.135	0.135	0.135
$Q(R_D)$	7000	5600	4000	7000
$Q(G)$	1500	1500	1200	1500
$Q(D)$	1500	1500	2500	1500
R	$6.21 \mu m$	$5.89 \mu m$	$5.09 \mu m$	$5.57 \mu m$
d_R	50	50	50	50
d_G	25	25	25	25
d_D	20	20	20	20
R_T^{max}	250	250	250	250
D_m^{max}	50	50	50	50

Tablica C.1: Vrijednosti parametara modela korištenih u pojedinim simulacijama. Konstante odgovaraju onima u jednažbama 2.1 - 2.7, dok je s Q je označen broj molekula određenog proteina, a s R radijus kruga.

Dodatak D Primjer implementacije metode konačnih elemenata

U ovom ćemo dodatku primijeniti matematički formalizam metode konačnih elemenata opisan u poglavlju 2.3 na konkretnom primjeru (Prilagođeno prema [38]).

Definicija problema: Radi jednostavnosti, raspis ćemo ograničiti na lijevu stranu modela, odnosno na jednadžbe koje se odnose na Rac1 i GAP. Sustav jednadžbi glasi:

$$\begin{aligned}\frac{\partial u}{\partial t} &= d_u \nabla^2 u, & \text{na } \Omega, \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= d_v \nabla^2 v, & \text{na } \Omega, \\ \frac{\partial r}{\partial t} &= -k_2 r v + u(r_{max} - r)(k_1 + k_{11} r + k_{12} s), & \text{na } \Gamma, \\ \frac{\partial s}{\partial t} &= k_2 r v - k_3 s, & \text{na } \Gamma.\end{aligned}\tag{D.1}$$

S u , v , r i s , smo radi preglednosti, označili koncentracije proteina koje smo prije označavali s R_D , G , R_T i G_k respektivno. r_{max} označava maksimalnu koncentraciju proteina r koju može poprimiti bilo koja točka ruba sustava. Zadani sustav želimo riješiti na domeni Ω s rubom Γ koji predstavlja proizvoljan geometrijski lik. Dodatni uvjet koji zahtijevamo je da populacije proteina r i s mogu poprimiti vrijednosti različite od nula samo na rubu domene Γ , što znači da su ti proteini ograničeni na membranu. Varijable u i v zadovoljavaju rubne uvjete:

$$\begin{aligned}d_u \frac{\partial u}{\partial n} &= J_u = k_3 s - u(r_{max} - r)(k_1 + k_{11} r + k_{12} s), \\ d_v \frac{\partial v}{\partial n} &= J_v = k_3 s - k_2 r v,\end{aligned}\tag{D.2}$$

dok su r i s ograničene na zatvoreni rub Γ te se podrazumijeva periodički rubni uvjet.

Prelazak na slabu formulaciju: Kao što je opisano ranije rješavanje počinjemo s prevođenjem sustava D.1 u slabu formulaciju, odnosno množenjem s test funkcijom ϕ :

$$\phi \frac{\partial u}{\partial t} = \phi d_u \nabla^2 u,$$

$$\begin{aligned}
\phi \frac{\partial v}{\partial t} &= \phi d_v \nabla^2 v , \\
\phi \frac{\partial r}{\partial t} &= \phi [-k_2 r v + u(r_{max} - r)(k_1 + k_{11} r + k_{12} s)] , \\
\phi \frac{\partial s}{\partial t} &= \phi [k_2 r v - k_3 s] ,
\end{aligned} \tag{D.3}$$

te integriranjem po cijeloj domeni:

$$\begin{aligned}
\int_{\Omega} \phi \frac{\partial u}{\partial t} d\Omega &= \int_{\Omega} \phi d_u \nabla^2 u d\Omega , \\
\int_{\Omega} \phi \frac{\partial v}{\partial t} d\Omega &= \int_{\Omega} \phi d_v \nabla^2 v d\Omega , \\
\int_{\Gamma} \phi \frac{\partial r}{\partial t} d\Gamma &= \int_{\Gamma} \phi [-k_2 r v + u(r_{max} - r)(k_1 + k_{11} r + k_{12} s)] d\Gamma , \\
\int_{\Gamma} \phi \frac{\partial s}{\partial t} d\Gamma &= \int_{\Gamma} \phi [k_2 r v - k_3 s] d\Gamma .
\end{aligned} \tag{D.4}$$

Primijetimo kako se u zadnje dvije jednadžbe integrali svode na integrale po rubu Γ , budući da su varijable r i s , a time i podintegralne funkcije, svugdje ostalo jednake nuli. U sljedećem koraku primjenjujemo Greenov identitet na prve dvije jednadžbe sustava D.4:

$$\begin{aligned}
\int_{\Omega} d_u \phi \nabla^2 u d\Omega &= \int_{\Gamma} \phi d_u \frac{\partial u}{\partial n} d\Gamma - \int_{\Omega} d_u (\nabla \phi) (\nabla u) d\Omega , \\
\int_{\Omega} d_v \phi \nabla^2 v d\Omega &= \int_{\Gamma} \phi d_v \frac{\partial v}{\partial n} d\Gamma - \int_{\Omega} d_v (\nabla \phi) (\nabla v) d\Omega .
\end{aligned} \tag{D.5}$$

Prvi integrali na desnoj strani gornjih jednadžbi sadrže struju varijabli u i v okomitu na rub, odnosno definiciju rubnih uvjeta D.2. Uvrštavanjem te relacije dobivamo:

$$\begin{aligned}
\int_{\Omega} \phi \frac{\partial u}{\partial t} d\Omega &= \int_{\Gamma} \phi [k_3 s - u(r_{max} - r)(k_1 + k_{11} r + k_{12} s)] d\Gamma - \int_{\Omega} d_u (\nabla \phi) (\nabla u) d\Omega , \\
\int_{\Omega} \phi \frac{\partial v}{\partial t} d\Omega &= \int_{\Gamma} \phi [k_3 s - k_2 r v] d\Gamma - \int_{\Omega} d_v (\nabla \phi) (\nabla v) d\Omega , \\
\int_{\Gamma} \phi \frac{\partial r}{\partial t} d\Gamma &= \int_{\Gamma} \phi [-k_2 r v + u(r_{max} - r)(k_1 + k_{11} r + k_{12} s)] d\Gamma , \\
\int_{\Gamma} \phi \frac{\partial s}{\partial t} d\Gamma &= \int_{\Gamma} \phi [k_2 r v - k_3 s] d\Gamma .
\end{aligned} \tag{D.6}$$

Diskretizacija domene: Nakon prelaska na slabu formulaciju spremni smo diskretizirati domenu Ω na kojoj rješavamo problem. Iz tog razloga uvodimo triangulaciju \mathcal{T} na Ω , odnosno podjelu domene na trokute, tako da najduža stranica nekog trokuta nije veća od h . Uz to uvodimo i pripadni konačnodimenzionalni Sobolovljev prostor S_h . Kao što je opisano u poglavlju 2.3 potreban nam je i skup funkcija oblika, na prostoru S_h . Jednako kao i prije biramo skup piramidalnih funkcija $\{\phi_i\}_{i=1}^{N_\Omega}$, gdje je N_Ω broj vrhova triangulacije. Budući da su dvije varijable definirane samo na rubu uvesti ćemo i podskup spomenutih funkcija koji je definiran i različit od nule samo na rubu Γ : $\{\psi_i\}_{i=1}^{N_\Gamma}$, gdje smo s N_Γ označili broj vrhova koji pripadaju rubu Γ . Sada možemo aproksimirati varijable sustava D.1 na poligonalnoj domeni $\Omega_h \subset \Omega$ (uz $\Gamma_h \subset \Gamma$) koju čini unija svih trokuta triangulacije \mathcal{T} . Približni izrazi za funkcije glase:

$$\begin{aligned}
u_h(x, y, t) &= \sum_{j=1}^{N_\Omega} u_j(t) \phi_j(x, y) , \\
v_h(x, y, t) &= \sum_{j=1}^{N_\Omega} v_j(t) \phi_j(x, y) , \\
r_h(x, y, t) &= \sum_{j=1}^{N_\Gamma} r_j(t) \psi_j(x, y) , \\
s_h(x, y, t) &= \sum_{j=1}^{N_\Gamma} s_j(t) \psi_j(x, y) .
\end{aligned} \tag{D.7}$$

Varijable u_j , v_j , r_j i s_j označavaju vrijednosti funkcija u vrhovima trokuta triangulacije \mathcal{T} dok su ϕ_j te ψ_j piramidalne funkcije koje poprimaju maksimalnu vrijednost u vrhu j . Diskretizirani oblik sustava D.1 možemo zapisati na način:

$$\begin{aligned}
\int_{\Omega_h} \phi_h \frac{\partial u_h}{\partial t} d\Omega_h &= \int_{\Gamma_h} \phi_h [k_3 s_h - u_h (r_{max} - r_h) (k_1 + k_{11} r_h + k_{12} s_h)] d\Gamma_h \\
&\quad - \int_{\Omega_h} d_u(\nabla \phi_h) (\nabla u_h) d\Omega_h , \\
\int_{\Omega_h} \phi_h \frac{\partial v_h}{\partial t} d\Omega_h &= \int_{\Gamma_h} \phi_h [k_3 s_h - k_2 r_h v_h] d\Gamma_h - \int_{\Omega_h} d_v(\nabla \phi_h) (\nabla v_h) d\Omega_h , \\
\int_{\Gamma_h} \phi_h \frac{\partial r_h}{\partial t} d\Gamma_h &= \int_{\Gamma_h} \phi_h [-k_2 r_h v_h + u_h (r_{max} - r_h) (k_1 + k_{11} r_h + k_{12} s_h)] d\Gamma_h ,
\end{aligned}$$

$$\int_{\Gamma_h} \phi_h \frac{\partial s_h}{\partial t} d\Gamma_h = \int_{\Gamma_h} \phi_h [k_2 r_h v_h - k_3 s_h] d\Gamma_h . \quad (\text{D.8})$$

Prije uvrštavanja izraza D.7 u sustav D.8 odaberimo još i oblik test funkcija ϕ_h . Najlakši mogući odabir je:

$$\begin{aligned} \phi_h(x, y) &= \phi_j(x, y) , & \text{u integralima po } \Omega_h , \\ \phi_h(x, y) &= \psi_j(x, y) , & \text{u integralima po } \Gamma_h , \end{aligned} \quad (\text{D.9})$$

u kojem opisujemo test funkcije skupom piramidalnih funkcija. Naravno, moguć je i drukčiji odabir test funkcija, no u većini je slučajeva to nepotrebno. Uvrštavanjem izraza D.7 i D.9 u sustav D.8 dobivamo:

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^{N_\Omega} \frac{\partial u_i}{\partial t} \int_{\Omega_h} \phi_j \phi_i d\Omega_h &= \sum_{i=1}^{N_\Gamma} k_3 s_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i d\Gamma_h - \sum_{i=1}^{N_\Omega} k_1 r_{max} u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i d\Gamma_h \\ &- \sum_{i=1}^{N_\Omega} (k_{11} r_{max} - k_1) u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right) d\Gamma_h - \sum_{i=1}^{N_\Omega} r_{max} k_{12} u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} s_k \psi_k \right) d\Gamma_h \\ &+ \sum_{i=1}^{N_\Omega} k_{11} u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right)^2 d\Gamma_h + \sum_{i=1}^{N_\Omega} k_{12} u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right) \left(\sum_{l=1}^{N_\Gamma} s_l \psi_l \right) d\Gamma_h \\ &- \sum_{i=1}^{N_\Omega} d_u u_i \int_{\Omega_h} (\nabla \phi_j) (\nabla \phi_i) d\Omega_h , \end{aligned} \quad (\text{D.10})$$

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^{N_\Omega} \frac{\partial v_i}{\partial t} \int_{\Omega_h} \phi_j \phi_i d\Omega_h &= \sum_{i=1}^{N_\Gamma} k_3 s_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i d\Gamma_h - \sum_{i=1}^{N_\Omega} k_2 v_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right) d\Gamma_h \\ &- \sum_{i=1}^{N_\Omega} d_v v_i \int_{\Omega_h} (\nabla \phi_j) (\nabla \phi_i) d\Omega_h , \end{aligned} \quad (\text{D.11})$$

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^{N_\Gamma} \frac{\partial r_i}{\partial t} \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i d\Gamma_h &= - \sum_{i=1}^{N_\Omega} k_2 v_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right) d\Gamma_h \\ &+ \sum_{i=1}^{N_\Omega} k_1 r_{max} u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i d\Gamma_h + \sum_{i=1}^{N_\Omega} (k_{11} r_{max} - k_1) u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right) d\Gamma_h \\ &+ \sum_{i=1}^{N_\Omega} r_{max} k_{12} u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} s_k \psi_k \right) d\Gamma_h - \sum_{i=1}^{N_\Omega} k_{11} u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right)^2 d\Gamma_h - \\ &\sum_{i=1}^{N_\Omega} k_{12} u_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right) \left(\sum_{l=1}^{N_\Gamma} s_l \psi_l \right) d\Gamma_h , \end{aligned} \quad (\text{D.12})$$

$$\begin{aligned}
\sum_{i=1}^{N_\Gamma} \frac{\partial s_i}{\partial t} \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i d\Gamma_h &= \sum_{i=1}^{N_\Omega} k_2 v_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \phi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} r_k \psi_k \right) d\Gamma_h \\
&\quad - \sum_{i=1}^{N_\Gamma} k_3 s_i \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i d\Gamma_h .
\end{aligned} \tag{D.13}$$

Prelazak na matricni oblik: Gornje jednadžbe moramo riješiti za svaki $j = 1, \dots, N_\Omega$, a sve zajedno možemo zapisati u matricnom obliku:

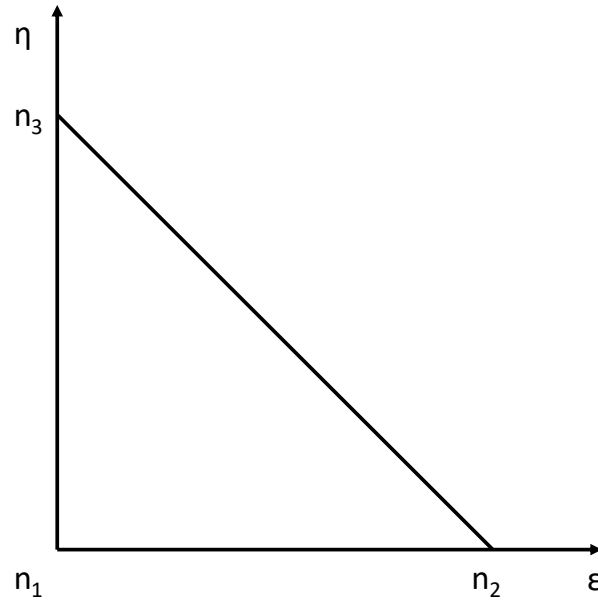
$$\begin{aligned}
M_\phi \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} &= -d_u A_\phi \vec{u} + k_3 M_\psi \vec{s} - (k_{11} r_{max} - k_1) B(\vec{r}) \vec{u} - r_{max} k_{12} B(\vec{s}) \vec{u} + k_{11} C(\vec{r}, \vec{r}) \vec{u} \\
&\quad + k_{12} C(\vec{r}, \vec{s}) \vec{u} , \\
M_\phi \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} &= -d_v A_\phi \vec{v} + k_3 M_\psi \vec{s} - k_2 B(\vec{r}) \vec{v} , \\
M_\psi \frac{\partial \vec{r}}{\partial t} &= -k_2 B(\vec{r}) \vec{v} + (k_{11} r_{max} - k_1) B(\vec{r}) \vec{u} + r_{max} k_{12} B(\vec{s}) \vec{u} - k_{11} C(\vec{r}, \vec{r}) \vec{u} \\
&\quad - k_{12} C(\vec{r}, \vec{s}) \vec{u} , \\
M_\psi \frac{\partial \vec{s}}{\partial t} &= k_2 B(\vec{r}) \vec{v} - k_3 M_\psi \vec{s} .
\end{aligned} \tag{D.14}$$

U zadnjem smo koraku uveli vektore $\vec{u} = (u_1, \dots, u_{N_\Omega})^T$, $\vec{v} = (v_1, \dots, v_{N_\Omega})^T$, $\vec{r} = (r_1, \dots, r_{N_\Gamma})^T$ i $\vec{s} = (s_1, \dots, s_{N_\Gamma})^T$ s članovima koji predstavljaju vrijednosti varijabli u vrhovima trokuta triangulacije \mathcal{T} i matrice:

$$\begin{aligned}
(M_\phi)_{ij} &= \int_{\Omega_h} \phi_j \phi_i d\Omega_h, \quad (M_\psi)_{ij} = \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i d\Gamma_h , \\
(A_\phi)_{ij} &= \int_{\Omega_h} (\nabla \phi_j) (\nabla \phi_i) d\Omega_h, \quad (B(\vec{a}))_{ij} = \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} a_k \psi_k \right) d\Gamma_h , \\
(C(\vec{a}, \vec{b}))_{ij} &= \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} a_k \psi_k \right) \left(\sum_{l=1}^{N_\Gamma} b_l \psi_l \right) d\Gamma_h .
\end{aligned} \tag{D.15}$$

Računanje matrica: Gornje matrice računamo kao sumaciju N_Ω integrala, preko zadanog elementa. Kako bi olakšali računanje integrala potrebno je uvesti glavni/referentni element. Budući da se naša mreža triangulacije sastoji od trokuta prirodno je i za referentni element odabrati trokut. Najjednostavniji mogući odabir je bilinearni

element prikazan na slici D.1, iako je moguće radi veće preciznosti izabrati trokutasti element sa 6 vrhova tako da dodamo vrh na polovište svake od stranica. Funkcije



Slika D.1: Prikaz referentnog elementa na kojem računamo pojedine matrice s označenim osima i vrhovima.

oblika na referentnom elementu glase:

$$\begin{aligned}\hat{\phi}_1 &= 1 - \epsilon - \eta, & \hat{\phi}_2 &= \epsilon, & \hat{\phi}_3 &= \eta, \\ \hat{\psi}_1 &= 1 - \epsilon, & \hat{\psi}_2 &= \epsilon, & \hat{\psi}_3 &= 0.\end{aligned}\tag{D.16}$$

Napomenimo dvije stvari vezane uz gornje izraze. Najprije smo odabrali da se stranica glavnog elementa $\overline{n_1 n_2}$ nalazi na rubu Γ_h zbog čega se η ne pojavljuje u izrazima za ψ_i te da funkcije zadovoljavaju izraze $\hat{\phi}_i(n_j) = \delta_{ij}$ za $i, j = 1, 2, 3$ i $\hat{\psi}_i(n_j) = \delta_{ij}$ za $i, j = 1, 2$. Nastavimo s računanjem matrica. Promotrimo najprije matricu A_ϕ . Kako bi izračunali njezine elemente moramo napraviti transformaciju koja prevodi svaki od elemenata triangulacije u referentni element. Koordinate x i y unutar svakog od elemenata možemo zapisati pomoću funkcija oblika na sljedeći način:

$$x = \sum_{j=1}^3 x_j^e \hat{\phi}_j(\epsilon, \eta), \quad y = \sum_{j=1}^3 y_j^e \hat{\phi}_j(\epsilon, \eta).\tag{D.17}$$

U gornjim su izrazima s x_j^e i y_j^e označene koordinate pojedinih vrhova trokuta. Iz relacije D.17 možemo izvesti derivacije i -te funkcije oblika po ϵ i η :

$$\begin{aligned}\frac{\partial \phi_i}{\partial \epsilon} &= \frac{\partial \phi_i}{\partial x} \frac{\partial x}{\partial \epsilon} + \frac{\partial \phi_i}{\partial y} \frac{\partial y}{\partial \epsilon}, \\ \frac{\partial \phi_i}{\partial \eta} &= \frac{\partial \phi_i}{\partial x} \frac{\partial x}{\partial \eta} + \frac{\partial \phi_i}{\partial y} \frac{\partial y}{\partial \eta},\end{aligned}\tag{D.18}$$

koje u kompaktnijem zapisu glase:

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial \hat{\phi}_i}{\partial \epsilon} \\ \frac{\partial \hat{\phi}_i}{\partial \eta} \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial x}{\partial \epsilon} & \frac{\partial y}{\partial \epsilon} \\ \frac{\partial x}{\partial \eta} & \frac{\partial y}{\partial \eta} \end{bmatrix} \begin{pmatrix} \frac{\partial \phi_i}{\partial x} \\ \frac{\partial \phi_i}{\partial y} \end{pmatrix}.\tag{D.19}$$

Matricu koja se pojavljuje pri ovakvom zapisu nazivamo Jakobijanom transformacije s pojedinog elementa na referentni element. Uvrštavanjem relacije D.17 u izraz za Jakobijan dobivamo:

$$J_e = \begin{bmatrix} x_2^e - x_1^e & x_3^e - x_1^e \\ y_2^e - y_1^e & y_3^e - y_1^e \end{bmatrix}.\tag{D.20}$$

U matrici A_ϕ nalaze se gradijenti funkcija oblika koje moramo izračunati. U tu svrhu koristimo upravo izvedenu transformaciju:

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial \phi_i}{\partial x} \\ \frac{\partial \phi_i}{\partial y} \end{pmatrix} = (J_e)^{-1} \begin{pmatrix} \frac{\partial \hat{\phi}_i}{\partial \epsilon} \\ \frac{\partial \hat{\phi}_i}{\partial \eta} \end{pmatrix}.\tag{D.21}$$

Jedino što nam još nedostaje u gornjem izrazu je inverz matrice Jakobijana koji glasi:

$$(J_e)^{-1} = \frac{1}{2A} \begin{bmatrix} y_3^e - y_1^e & y_1^e - y_2^e \\ x_1^e - x_3^e & x_2^e - x_1^e \end{bmatrix}.\tag{D.22}$$

Razlomak ispred matrice u gornjoj relaciji dolazi od determinante matrice, koja je jednaka $2A$ (gde je A površina trokuta kojeg transformiramo), s kojom moramo podijeliti izraz prilikom određivanja inverza. Uvrštavanjem svega što smo upravo izveli u izraz za matricu A_ϕ D.15 dobivamo:

$$(A_\phi)_{ij} = \int_{\hat{E}} ((J_e)^{-1} \nabla \hat{\phi}_j) ((J_e)^{-1} \nabla \hat{\phi}_i) |J_e| d\epsilon d\eta.\tag{D.23}$$

Gradijente u gornjem izrazu trivijalno je izračunati, budući da su ϕ_i linearne funkcije varijabli ϵ i η . Dodatna determinanta Jakobijana dolazi zbog prelaska integrala s

domene Ω_h na domenu referentnog trokuta koju smo označili s \hat{E} . Matrica A_ϕ za neki element e poprima oblik:

$$\begin{bmatrix} [(y_3^e - y_2^e)^2 + (x_3^e - x_2^e)^2] & [(y_3^e - y_2^e)(y_1^e - y_3^e) + (x_3^e - x_2^e)(x_1^e - x_3^e)] & [(y_3^e - y_2^e)(y_2^e - y_1^e) + (x_3^e - x_2^e)(x_2^e - x_1^e)] \\ [(y_3^e - y_2^e)(y_1^e - y_3^e) + (x_3^e - x_2^e)(x_1^e - x_3^e)] & [(y_1^e - y_3^e)^2 + (x_1^e - x_3^e)^2] & [(y_1^e - y_3^e)(y_2^e - y_1^e) + (x_1^e - x_3^e)(x_2^e - x_1^e)] \\ [(y_3^e - y_2^e)(y_2^e - y_1^e) + (x_3^e - x_2^e)(x_2^e - x_1^e)] & [(y_1^e - y_3^e)(y_2^e - y_1^e) + (x_1^e - x_3^e)(x_2^e - x_1^e)] & [(y_2^e - y_1^e)^2 + (x_2^e - x_1^e)^2] \end{bmatrix}. \quad (\text{D.24})$$

Ostale matrice mnogo su jednostavnije za izračunati budući da ne moramo računati gradijente funkcija oblika. Matrice M_ϕ te M_ψ glase:

$$(M_\phi)_{ij} = \int_{\Omega_h} \phi_j \phi_i d\Omega_h = \int_{\hat{E}} \hat{\phi}_j \hat{\phi}_i |J_e| d\epsilon d\eta, \quad (\text{D.25})$$

$$(M_\psi)_{ij} = \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i d\Gamma_h = \int_{\hat{E}} \hat{\psi}_j \hat{\psi}_i \frac{d\Gamma}{d\epsilon} d\epsilon. \quad (\text{D.26})$$

Derivacija $\frac{d\Gamma}{d\epsilon}$ koja se pojavila u zadnjem izrazu za linearnu geometriju jednaka je dužini stranice trokuta na kojem računamo integral (i koju ćemo označiti s L). Primijetimo da spomenuti integral računamo samo po stranici $\overline{n_1 n_2}$ referentnog trokuta, budući da smo prije zahtijevali mapiranje u kojem je ta stranica dio domene Γ_h . Računanjem integrala dobivamo:

$$M_\phi = \frac{L}{12} \begin{bmatrix} 2 & 1 & 1 \\ 1 & 2 & 1 \\ 1 & 1 & 2 \end{bmatrix}, \quad (\text{D.27})$$

$$M_\psi = \frac{L}{16} \begin{bmatrix} 2 & 1 & 0 \\ 1 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad (\text{D.28})$$

Matrice $B_\psi(\vec{a})$ i $C_\psi(\vec{a}, \vec{b})$ koje ovise o proizvoljnim vektorima \vec{a} i \vec{b} računaju se na sličan način:

$$(B_\psi(\vec{a}))_{ij} = \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} a_k \psi_k \right) d\Gamma_h = \int_{\hat{E}} \hat{\psi}_j \hat{\psi}_i (a_1^e (1 - \epsilon) + a_2^e \epsilon) \frac{d\Gamma}{d\epsilon} d\epsilon, \quad (\text{D.29})$$

$$(C_\psi(\vec{a}, \vec{b}))_{ij} = \int_{\Gamma_h} \psi_j \psi_i \left(\sum_{k=1}^{N_\Gamma} a_k \psi_k \right) d\Gamma_h$$

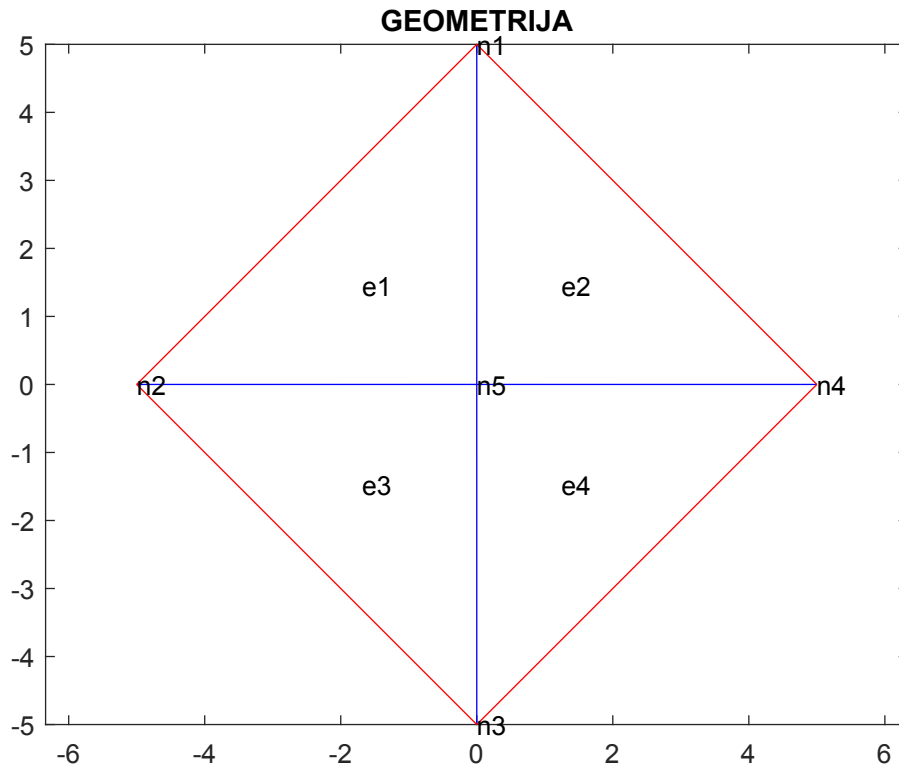
$$= \int_{\hat{E}} \hat{\psi}_j \hat{\psi}_i (a_1^e(1-\epsilon) + a_2^e \epsilon) (b_1^e(1-\epsilon) + b_2^e \epsilon) \frac{d\Gamma}{d\epsilon} d\epsilon, \quad (\text{D.30})$$

i iznose:

$$B_\psi(\vec{a}) = \frac{L}{12} \begin{bmatrix} 3a_1^e + a_2^e & a_1^e + a_2^e & 0 \\ a_1^e + a_2^e & a_1^e + 3a_2^e & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad (\text{D.31})$$

$$C_\psi(\vec{a}, \vec{b}) = \frac{L}{60} \begin{bmatrix} 12a_1^{e2} + 6a_1^e a_2^e + 2a_2^{e2} & 10a_1^e a_2^e + 3(a_1^e - a_2^e)^2 & 0 \\ 10a_1^e a_2^e + 3(a_1^e - a_2^e)^2 & 2a_1^{e2} + 6a_1^e a_2^e + 12a_2^{e2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}. \quad (\text{D.32})$$

Sastavljanje globalnog sustava: Nakon što smo izračunali vrijednosti matrica za pojedine elemente moramo sve skupa povezati u globalni sustav koji se odnosi na cijelu triangulaciju. Radi jednostavnosti i preglednosti koristit ćemo mrežu s četiri elementa i pet vrhova prikazanu na slici D.2. Prije sastavljanja globalne matrice



Slika D.2: Prikaz FEM mreže s četiri elementa.

potrebna nam je matrica koja povezuje pojedine elemente i njihove vrhove:

$$LtoG = \begin{bmatrix} 2 & 1 & 5 \\ 1 & 4 & 5 \\ 3 & 2 & 5 \\ 4 & 3 & 5 \end{bmatrix}. \quad (D.33)$$

Retci gornje matrice odnose se na pojedine elemente, dok se stupci odnose na vrhove tih elemenata. Globalnu matricu (npr. M^e) konstruiramo na način:

$$(M^e)_{ij \rightarrow (M^G)_{IJ}}; \quad I = LtoG(e, i), \quad J = LtoG(e, j). \quad (D.34)$$

Koristeći gornji postupak dobivamo matricu M^G oblika:

$$\begin{bmatrix} M_{22}^1 + M_{11}^2 & M_{21}^1 & 0 & M_{12}^2 & M_{23}^1 + M_{13}^2 \\ M_{21}^1 & M_{11}^1 + M_{22}^3 & M_{21}^3 & 0 & M_{13}^1 + M_{23}^3 \\ 0 & M_{21}^3 & M_{11}^3 + M_{22}^4 & M_{21}^4 & M_{13}^3 + M_{23}^4 \\ M_{21}^2 & 0 & M_{12}^4 & M_{22}^2 + M_{11}^4 & M_{23}^2 + M_{13}^4 \\ M_{23}^1 + M_{13}^2 & M_{13}^1 + M_{23}^3 & M_{13}^3 + M_{23}^4 & M_{23}^2 + M_{13}^4 & M_{33}^1 + M_{33}^2 + M_{33}^3 + M_{33}^4 \end{bmatrix}. \quad (D.35)$$

Matrice M_ϕ^G , M_ψ^G , A_ϕ^G , $B^G(\vec{a})$ i $C^G(\vec{a}, \vec{b})$ za ovaj konkretni slučaj prikazane su na sljedeće dvije stranice. Rubni uvjeti su kroz integrale po rubu Γ_h . Cijeli sustav u matricnom obliku ima isti izgled kao sustav D.14, s time da svaki od vektora općenito ima toliko članova koliko ima vrhova u mreži (u ovom konkretnom primjeru 5), a svaka matrica ima dimenziju jednaku broj vrhova \times broj vrhova (u ovom slučaju 5×5). Kako bi pronašli rješenja početnog problem preostaje zadati početne uvjete te izračunati sustav jednadžbi D.14, koristeći matrice M_ϕ^G , M_ψ^G , A_ϕ^G , $B^G(\vec{a})$ i $C^G(\vec{a}, \vec{b})$. Za svrhu ovog diplomskog rada korišten je kod napisan u programu MATLAB, budući da taj program posjeduje već gotove funkcije koje znatno olakšavaju primjenu metode konačnih elemenata. Tijek koda je sljedeći: najprije generiramo mrežu ugrađenom funkcijom *generateMesh*, zatim izračunamo matrice za dobivenu mrežu te zadamo početne uvjete, dok u zadnjem koraku koristimo ugrađenu funkciju *ode15s* kako bi riješili semidiskretan problem. Spomenimo kako je matrice B^G i C^G potrebno računati iznova za svaki vremenski korak prilikom rješavanja.

$$M_\phi^G = \begin{bmatrix} 4.1664 & 1.0415 & 0 & 1.0417 & 2.0835 \\ 1.0415 & 4.1664 & 1.0417 & 0 & 2.0835 \\ 0 & 1.0417 & 4.1669 & 1.0418 & 2.0835 \\ 1.0417 & 0 & 1.0418 & 4.1669 & 2.0835 \\ 2.0832 & 2.0832 & 2.0835 & 2.0835 & 8.3333 \end{bmatrix}, \quad M_\psi^G = \begin{bmatrix} 4.7140 & 1.1786 & 0 & 1.1785 & 0 \\ 1.1786 & 4.7140 & 1.1785 & 0 & 0 \\ 0 & 1.1785 & 4.7140 & 1.1785 & 0 \\ 1.1785 & 0 & 1.1785 & 4.7140 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix},$$

$$A_\phi^G = \begin{bmatrix} 1.0001 & 6.0678 \cdot 10^{-5} & 0 & -3.6814 \cdot 10^{-9} & -1.0001 \\ 6.0678 \cdot 10^{-5} & 1.0001 & -3.6814 \cdot 10^{-9} & 0 & -1.0001 \\ 0 & -3.6814 \cdot 10^{-9} & 0.9999 & -6.0671 \cdot 10^{-5} & -0.9999 \\ -3.6814 \cdot 10^{-9} & 0 & -6.0671 \cdot 10^{-5} & 0.9999 & -0.9999 \\ -1.0001 & -1.0001 & -0.9999 & -0.9999 & 4.0000 \end{bmatrix},$$

$$B^G(\vec{a}) = \begin{bmatrix} \frac{5\sqrt{2}}{12}(6a_1 + a_2 + a_4) & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_1 + a_2) & 0 & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_1 + a_4) & 0 \\ \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_1 + a_2) & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_1 + 6a_2 + a_3) & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_2 + a_3) & 0 & 0 \\ 0 & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_2 + a_3) & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_2 + 6a_3 + a_4) & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_3 + a_4) & 0 \\ \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_1 + a_4) & 0 & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_3 + a_4) & \frac{5\sqrt{2}}{12}(a_1 + a_3 + 6a_4) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix},$$

$$\begin{aligned}
C^G(\vec{a}, \vec{b}) = & \begin{array}{cccc}
\frac{\sqrt{2}}{12}(24a_1b_1 + 3a_1b_2 + 3a_2b_1 + 2a_2b_2 + 3a_4b_1 + 2a_4b_4) & & \frac{\sqrt{2}}{12}(3a_1b_1 + 2a_1b_2 + 2a_2b_1 + 3a_2b_2) & \\
\frac{\sqrt{2}}{12}(3a_1b_1 + 2a_1b_2 + 2a_2b_1 + 3a_2b_2) & & \frac{\sqrt{2}}{12}(2a_1b_1 + 3a_1b_2 + 3a_2b_1 + 24a_2b_2 + 3a_2b_3 + 3a_3b_2 + 2a_3b_3) & \\
0 & & \frac{\sqrt{2}}{12}(3a_2b_2 + 2a_2b_3 + 2a_3b_2 + 3a_3b_3) & \\
\frac{\sqrt{2}}{12}(3a_1b_1 + 2a_2b_4 + 2a_4b_1 + 3a_4b_4) & & 0 & \\
0 & & 0 & \\
0 & & \frac{\sqrt{2}}{12}(3a_1b_1 + 2a_2b_4 + 2a_4b_1 + 3a_4b_4) & 0 \\
\frac{\sqrt{2}}{12}(3a_2b_2 + 2a_2b_3 + 2a_3b_2 + 3a_3b_3) & & 0 & 0 \\
\frac{\sqrt{2}}{12}(2a_2b_2 + 3a_2b_3 + 3a_3b_2 + 24a_3b_3 + 3a_3b_4 + 3a_4b_3 + 2a_4b_4) & & \frac{\sqrt{2}}{12}(3a_3b_3 + 2a_3b_4 + 2a_4b_3 + 3a_4b_4) & 0 \\
\frac{\sqrt{2}}{12}(3a_3b_3 + 2a_3b_4 + 2a_4b_3 + 3a_4b_4) & & \frac{\sqrt{2}}{12}(2a_1b_1 + 3a_1b_4 + 3a_4b_1 + 24a_4b_4 + 2a_3b_3 + 3a_3b_4 + 3a_4b_3) & 0 \\
0 & & 0 & 0
\end{array}
\end{aligned}$$

Literatura

- [1] Geoffrey M Cooper and Robert E Hausman. *The cell: a molecular approach*, volume 10. ASM press Washington, DC, 2000.
- [2] Sung H Lee and Roberto Dominguez. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Molecules and cells*, 29(4):311–325, 2010.
- [3] Pieta K Mattila and Pekka Lappalainen. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(6):446–454, 2008.
- [4] Alexander Mogilner and George Oster. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophysical journal*, 71(6):3030–3045, 1996.
- [5] Mikael Häggström. Medical gallery of mikael häggström 2014. *WikiJournal of Medicine*, 1(2), 2009.
- [6] Thomas D Pollard and Gary G Borisy. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4):453–465, 2003.
- [7] College of Science University of Minnesota and School of Mathematics Engineering. Cell motility. <https://math.umn.edu/mathbio/cell-motility>, 2019.
- [8] MBInfo National University of Singapore. Actin crosslinking. <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/actin-crosslinking/>, 2018.
- [9] M. Marinović. *Dinamika GTPaza Rac1 i njihova uloga u regulaciji polarnosti stanica Dictyostelium discoideum*. PhD thesis, Biološki odsjek Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilište u Zagrebu, Rooseveltov trg 6. 10000 Zagreb, 2015.
- [10] Rafael Garcia-Mata, Etienne Boulter, and Keith Burridge. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8):493–504, 2011.
- [11] Vedrana Filić, Maja Marinović, Jan Faix, and Igor Weber. The IQGAP-related protein DGAP1 mediates signaling to the actin cytoskeleton as an effector and a sequester of Rac1 GTPases. *Cellular and molecular life sciences*, 71(15):2775–2785, 2014.

- [12] Francisco Rivero and Huajiang Xiong. Chapter Two - Rho Signaling in *Dicystostelium discoideum*. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, volume 322, pages 61 – 181. Academic Press, 2016.
- [13] Liang Li, Simon F Nørrelykke, and Edward C Cox. Persistent cell motion in the absence of external signals: a search strategy for eukaryotic cells. *PLoS one*, 3(5):e2093, 2008.
- [14] Carsten Beta and Karsten Kruse. Intracellular oscillations and waves. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 8:239–264, 2017.
- [15] Alan M Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Bulletin of mathematical biology*, 52(1-2):153–197, 1990.
- [16] Jacob Halatek, Fridtjof Brauns, and Erwin Frey. Self-organization principles of intracellular pattern formation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1747):2017.0107, 2018.
- [17] Hans Meinhardt and Alfred Gierer. Generation and regeneration of sequence of structures during morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 85(3):429 – 450, 1980.
- [18] Dominik Thalmeier, Jacob Halatek, and Erwin Frey. Geometry-induced protein pattern formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(3):548–553, 2016.
- [19] Alexandra Jilkine, Athanasios FM Marée, and Leah Edelstein-Keshet. Mathematical model for spatial segregation of the Rho-family GTPases based on inhibitory crosstalk. *Bulletin of mathematical biology*, 69(6):1943–1978, 2007.
- [20] Jian-Geng Chiou, Samuel A Ramirez, Timothy C Elston, Thomas P Witelski, David G Schaeffer, and Daniel J Lew. Principles that govern competition or co-existence in Rho-GTPase driven polarization. *PLoS computational biology*, 14(4):e1006095, 2018.
- [21] Changji Shi, Chuan-Hsiang Huang, Peter N Devreotes, and Pablo A Iglesias. Interaction of motility, directional sensing, and polarity modules recreates the behaviors of chemotaxing cells. *PLoS computational biology*, 9(7):e1003122, 2013.

- [22] Chuan-Hsiang Huang, Ming Tang, Changji Shi, Pablo A Iglesias, and Peter N Devreotes. An excitable signal integrator couples to an idling cytoskeletal oscillator to drive cell migration. *Nature cell biology*, 15(11):1307–1316, 2013.
- [23] Yuchuan Miao, Sayak Bhattacharya, Marc Edwards, Huaqing Cai, Takanari Inoue, Pablo A Iglesias, and Peter N Devreotes. Altering the threshold of an excitable signal transduction network changes cell migratory modes. *Nature cell biology*, 19(4):329–340, 2017.
- [24] Vedrana Filić, Maja Marinović, Jan Faix, and Igor Weber. A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *Journal of Cell Science*, 125(2):387–398, 2012.
- [25] Marko Šoštar. Neobjavljeni rezultati.
- [26] Yusuke T Maeda, Junya Inose, Miki Y Matsuo, Suguru Iwaya, and Masaki Sano. Ordered patterns of cell shape and orientational correlation during spontaneous cell migration. *PloS one*, 3(11):e3734, 2008.
- [27] Thomas Killich, Peter J Plath, Xiang Wei, Heino Bultmann, Ludger Rensing, and Michael G Vicker. The locomotion, shape and pseudopodial dynamics of unstimulated Dictyostelium cells are not random. *Journal of Cell Science*, 106(4):1005–1013, 1993.
- [28] Anotida Madzvamuse and Andy HW Chung. The bulk-surface finite element method for reaction-diffusion systems on stationary volumes. *Finite Elements in Analysis and Design*, 108:9–21, 2016.
- [29] Necibe Tuncer, Anotida Madzvamuse, and AJ Meir. Projected finite elements for reaction-diffusion systems on stationary closed surfaces. *Applied Numerical Mathematics*, 96:45–71, 2015.
- [30] Massimo Frittelli, Anotida Madzvamuse, Ivonne Sgura, and Chandrasekhar Venkataraman. Lumped finite elements for reaction-cross-diffusion systems on stationary surfaces. *Computers & Mathematics with Applications*, 74(12):3008–3023, 2017.

- [31] Anne-Christine Butty, Nathalie Perrinjaquet, Audrey Petit, Malika Jaquenoud, Jeffrey E Segall, Kay Hofmann, Catherine Zwahlen, and Matthias Peter. A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *The EMBO journal*, 21(7):1565–1576, 2002.
- [32] Vidar Thomée. *Galerkin finite element methods for parabolic problems*, volume 1054. Springer, 1984.
- [33] Igor Weber. Is there a pilot in a pseudopod? *European journal of cell biology*, 85(9-10):915–924, 2006.
- [34] Maja Marinović, Marko Šoštar, Vedrana Filić, Vlatka Antolović, and Igor Weber. Quantitative imaging of Rac1 activity in Dictyostelium cells with a fluorescently labelled GTPase-binding domain from DPAKa kinase. *Histochemistry and cell biology*, 146(3):267–279, 2016.
- [35] Curtis T Rueden, Johannes Schindelin, Mark C Hiner, Barry E DeZonia, Alison E Walter, Ellen T Arena, and Kevin W Eliceiri. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics*, 18(1):529, 2017.
- [36] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7):676–682, 2012.
- [37] Piotr Baniukiewicz, Sharon Collier, and Till Bretschneider. QuimP: analyzing transmembrane signalling in highly deformable cells. *Bioinformatics*, 34(15):2695–2697, 2018.
- [38] Dr. Cüneyt Sert. Lecture Notes for ME 582 Finite Element Analysis in Thermo-fluids. http://users.metu.edu.tr/csert/teaching_notes.htm, 2019.