

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Vlatka Antolović

**Istraživanje gibanja stanica u okviru poopćenog Langevinovog
modela kod protista *Dictyostelium discoideum* Raper (1935)**

Doktorska disertacija

Osijek, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Istraživanje gibanja stanica u okviru poopćenog Langevinovog modela kod protista *Dictyostelium discoideum* Raper (1935)

Vlatka Antolović

Rad je izrađen u: Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu

Mentor: prof. dr. sc. Igor Weber

Kratak sažetak doktorskog rada:

Analizirana je migracija stanica dvaju sojeva *D. discoideum*, divljeg tipa AX2 i stanica deficitarnih za korteksiline, u različitim fazama životnog ciklusa – vegetativnoj i agregacijski kompetentnoj fazi. Nenadziranom klasifikacijom svih promatranih stanica identificirane su tri skupine koje se razlikuju prvenstveno po srednjoj brzini kretanja i niskofrekventnom području u periodogramu vektora brzine. Za svaku podskupinu stanica identificiranu unutar pojedine biološke populacije određeni su parametri Langevinovog modela proširenog memorijskim članom.

Broj stranica: 112

Broj slika: 40

Broj tablica: 12

Broj literaturnih navoda: 120

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: aktinski citoskelet, *Dictyostelium discoideum*, korteksilini, Langevinov model, nenadzirana klasifikacija, stanično gibanje

Datum obrane: 7. listopada 2014.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Krunoslav Brčić-Kostić, viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković, predsjednik
2. prof. dr. sc. Igor Weber, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković, mentor i član
3. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, član
4. dr. sc. Iva Tolić, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković, zamjena člana

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

Motility of *Dictyostelium discoideum* cells studied within the framework of a generalized Langevin model

Vlatka Antolović

Thesis performed at: Laboratory for Electron Microscopy, Division of Molecular Biology, Ruder Bošković Institute, Zagreb

Supervisor: Prof. Igor Weber, PhD

Short abstract:

Migration of cells from two strains of *D. discoideum*, the wild-type strain AX2 and a strain lacking cortexillins, has been analyzed in different stages of their life cycle – vegetative and aggregation-competent. Three clusters were identified among all monitored cells by unsupervised clustering, and the two most discriminative features were average speed and low-frequency region of the velocity periodogram. Parameters of the generalized Langevin model extended with a memory term were determined for all subpopulations identified within each strain in both developmental stages.

Number of pages: 112

Number of figures: 40

Number of tables: 12

Number of references: 120

Original in: Croatian

Key words: actin cytoskeleton, cell motility, cluster analysis, cortexillins, *Dictyostelium discoideum*, Langevin model

Date of the thesis defense: October 7th, 2014

Reviewers:

1. Krunoslav Brčić-Kostić, PhD, Senior Research Associate, Ruder Bošković Institute
2. Prof. Igor Weber, PhD, Senior Scientist, Ruder Bošković Institute
3. Prof. Vera Cesar, PhD, Full Professor, J.J. Strossmayer University of Osijek
4. Iva Tolić, PhD, Senior Scientist, Ruder Bošković Institute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju
Zavoda za molekularnu biologiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, pod
vodstvom prof. dr. sc. Igora Webera.

Ovim putem zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Igoru Weberu na povjerenju i pruženoj prilici za izradu doktorske disertacije u području znanosti u kojem se isprepliću biologija, biofizika i bioinformatika. Veliko hvala i studijskom savjetniku dr. sc. Tomislavu Šmucu na savjetima i idejama vezanim uz metode nenadzirane klasifikacije i optimizacije.

Hvala kolegama i kolegicama sa Zavoda za molekularnu biologiju i Instituta Ruđer Bošković na prijateljskoj podršci kroz sve ove godine rada. Posebice hvala kolegici Maji Marinović, bez čije bi bezrezervne podrške ovaj put sigurno bio teži.

Veliko hvala roditeljima i obitelji na svojoj pruženoj ljubavi i sigurnosti. Posebno hvala mom bratu Bojanu Antoloviću, koji me još od malih nogu uveo u divan svijet znanosti.

I na kraju, hvala prijateljima, koji su uz mene sve ove godine.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Stanično gibanje	2
1.1.1. Molekularna osnova staničnog gibanja.....	4
1.2. Različiti pristupi istraživanju staničnog gibanja	7
1.3. Kratak uvod u Brownovo gibanje i Langevinovu jednadžbu.....	7
1.4. Teorijski modeli gibanja stanica	9
1.4.1. Model korišten u ovom radu	10
1.5. Protist <i>Dictyostelium discoideum</i> kao modelni organizam	11
1.6. Kvaziperiodičnost u gibanju stanica protista <i>D. discoideum</i>	14
1.7. Korteksilin I i II u stanicama protista <i>D. discoideum</i>	16
1.7.1. Uloga korteksilina u čvrstoći staničnog korteksa i citokinezi	17
1.7.2. Uloga korteksilina u kemotaksiji stanica	18
1.7.3. Kompleks korteksilina s malom GTP-azom Rac1A i proteinom DGAP1	20
1.8. Ciljevi istraživanja.....	21
2. Materijali i metode.....	22
2.1. Rad s kulturama stanica protista <i>D. discoideum</i>	23
2.1.1. Korišteni sojevi	23
2.1.2. Uzgoj stanica.....	23
2.1.3. Trajne kulture stanica.....	24
2.1.4. Inducirani prelazak stanica <i>D. discoideum</i> u fazu razvoja.....	25
2.2. Mikroskopija stanica	25
2.3. Analiza filmova	27
2.4. Analiza trajektorija.....	27
2.4.1. Analiza vremenskih serija.....	28
2.5. Grupiranje podataka	30

2.5.1.	Metoda grupiranja podataka	30
2.5.2.	Identifikacija različitih skupina stanica	31
2.6.	Procjena parametara poopćenog Langevinovog modela gibanja	33
2.6.1.	Simulacija trajektorija.....	33
2.6.2.	Karakterizacija podskupina stanica.....	34
2.6.3.	Diferencijalni evolucijski algoritam	35
2.6.4.	Procjena parametara modela	37
3.	Rezultati	39
3.1.	Gibanje stanica promatranih populacija <i>D. discoideum</i>	40
3.2.	Raspodjela stanica u skupine na temelju individualnih karakteristika gibanja.....	45
3.2.1.	Karakteristike gibanja pojedinih stanica.....	46
3.2.2.	Identifikacija skupina stanica.....	47
3.2.3.	Raspodjela identificiranih skupina unutar različitih populacija.....	49
3.3.	Karakteristike gibanja identificiranih podskupina stanica	51
3.4.	Parametri poopćenog Langevinovog modela gibanja podskupina stanica.....	55
4.	Rasprava.....	58
4.1.	Gibanje stanica protista <i>D. discoideum</i> deficitarnih za korteksiline I i II	59
4.2.	Identifikacija podskupina u populacijama AX2 i CI/CIH stanica	62
4.3.	Karakterizacija stanica parametrima poopćenog Langevinovog modela gibanja.....	65
4.3.1.	Parametri identificiranih podskupina stanica.....	65
4.3.2.	Različiti oblici poopćenog Langevinovog modela	69
4.3.3.	Daljnje smjernice	71
5.	Zaključci	72
6.	Literatura.....	74
7.	Sažetak	84
8.	Summary	87
9.	Popis kratica.....	90

10.	Prilozi.....	93
10.1.	Ovisnost akceleracije o brzini u pojedinim podskupinama stanica.....	94
10.2.	Simulacija trajektorija u programskom paketu Mathematica.....	95
10.3.	Parametri različitih oblika proširenog Langevinovog modela	95
10.4.	Uspješnost procjene parametara pojedinih podskupina stanica	99
11.	Životopis	110

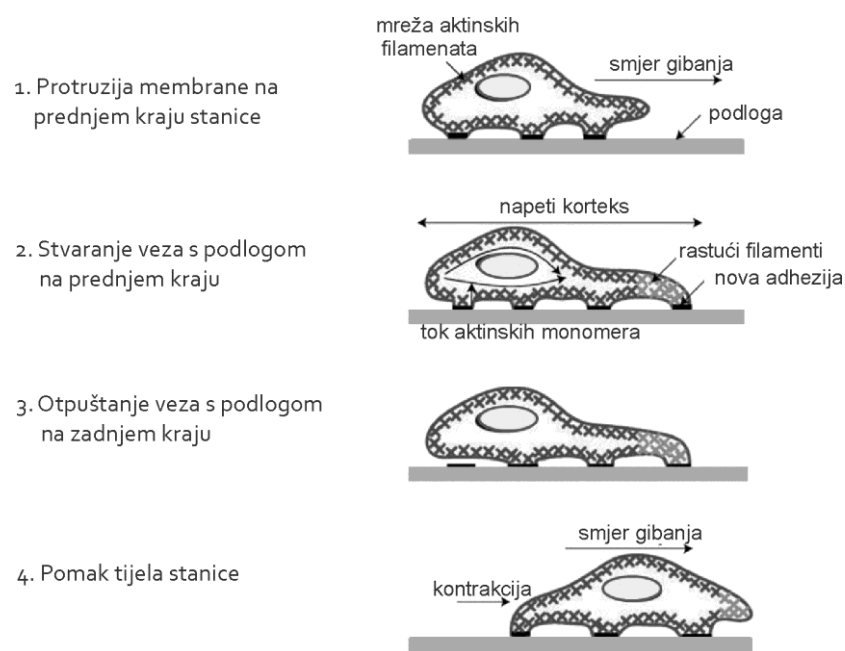
1. Uvod

1.1. Stanično gibanje

Stanično gibanje ima ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima. Tijekom embriogeneze, kontrolirana migracija stanica omogućuje pravilnu morfogenezu, počevši od gastrulacije pa sve do razvoja živčanog sustava jedinke (Kurosaka i Kashina, 2008). Gibanje stanica potom ostaje sastavnica normalne fiziologije odraslog organizma: u imunom odgovoru, izgradnji tkiva i zacjeljivanju rana te stvaranju neuronskih veza ekstenzijom aksona živčanih stanica (Dent i Gertler, 2003; Hartman i sur., 1994; Stokes i sur., 1991; Suraneni i sur., 2012). Na primjer, leukociti putuju po organizmu tražeći strana tijela, fibroblasti migriraju na mjesto ozljede i pomažu u zacjeljivanju rana, a stanice endotela u potrazi za sebi sličnim stanicama izgrađuju unutarnje stjenke krvožilnog i limfnog sustava. Čak i u patološkim procesima gibanje stanica igra bitnu ulogu – tijekom metastaziranja tumorske stanice migriraju s mjesta primarnog tumora u krvožilni sustav i dalje u druge dijelove organizma (Friedl i Wolf, 2003). Gibanje stanica bitno je i u tkivnom inženjerstvu, čiji prvi korak uključuje nastanjenje stanica na osnovu sačinjenu od biomaterijala (Magnani i sur., 2003).

Sve stanice navedene u prethodnom odlomku gibaju se ameboidno. Pod ameboidnim gibanjem smatra se gibanje koje ne zahtjeva upotrebu organela poput bičeva (lat. *flagellum*), već se odvija protruzijama membrane i kontrakcijama tijela stanice (Lämmermann i Sixt, 2009; Van Haastert, 2011). Ameboidno stanično gibanje sastoji se od nekoliko elementarnih procesa: polarizacije stanice, ekstenzije membrane, stvaranja veza između stanice i podloge, kontrakcije stanice, te otpuštanja veza sa podlogom (Lauffenburger i Horwitz, 1996; Rafelski i Theriot, 2004; Carlier, 2010). Tijekom polarizacije stanice dolazi do nastanka prostorne asimetrije i jasnog razlikovanja prednjeg i stražnjeg dijela stanice. U stanici dolazi do preraspodjele signalnih i regulatornih molekula što kao posljedicu ima intenzivnu polimerizaciju aktina na prednjem dijelu stanice i nastanak protruzija na tom dijelu stanične membrane. Ovako nastale ekstenzije na membrani imaju ključnu ulogu u gibanju stanice i mogu se po strukturi podijeliti na lamelipodije, filopodije i pseudopodije (Rafelski i Theriot, 2004; Weber, 2006). Lamelipodiji su tanke široke strukture sačinjene od gusto umreženih aktinskih niti, a formiraju ih uglavnom stanice epitela i

fibroblasti, dok su pseudopodiji deblje i kompaktnije strukture s više usnopljenim a slabije umreženim filamentima, tipični za amebe i neutrofile (Alberts i sur., 2002). Filopodiji su tanke i uske igličaste strukture sačinjene od usnopljenih aktinskih filamenata, čija je funkcija uglavnom istraživanje okoline, npr. pri ekstenziji aksona (DeMali i Burridge, 2003). Zbog gustoće aktinskog citoskeleta, unutar navedenih struktura nema staničnih organela. Na mjestu nastale protruzije membrane dolazi do stvaranja kontaktnih struktura, npr. fokalnih adhezija, između stanice i podloge, koje omogućuju prijenos mehaničke sile (Beningo i sur., 2001). U kontrakciji citoskeleta zatim sudjeluje aktinsko-miozinski kompleks koji omogućuje pomicanje tijela stanice u smjeru formirane ekstenzije membrane (Jay i sur., 1995; Lombardi i sur., 2007). Da bi došlo do pomaka stanice potrebno je da sila kontrakcije bude veća od sile trakcije između zadnjeg dijela stanice i podloge po kojoj se kreće (Lauffenburger i Horwitz, 1996). Samim time, potrebna je asimetrija između sila trakcije na zadnjem i na prednjem dijelu stanice, koja omogućuje zadržavanje prednjih veza stanice s podlogom, uz istovremeno otpuštanje takvih veza sa zadnjeg dijela stanice (Lauffenburger i Horwitz, 1996). Adhezivni kompleksi, koji čine vezu stanice s podlogom, otpuštaju se tijekom kontrakcije stanice u citoplazmu ili, s dijelovima membrane koji više ne sadrže komponente citoskeleta, ostaju na podlozi i odvajaju se od stanice (Parsons i sur., 2010).



Slika 1.1. Shema pomaka stanice (prilagođeno prema *Ananthkrishnan i Ehrlicher, 2007*).

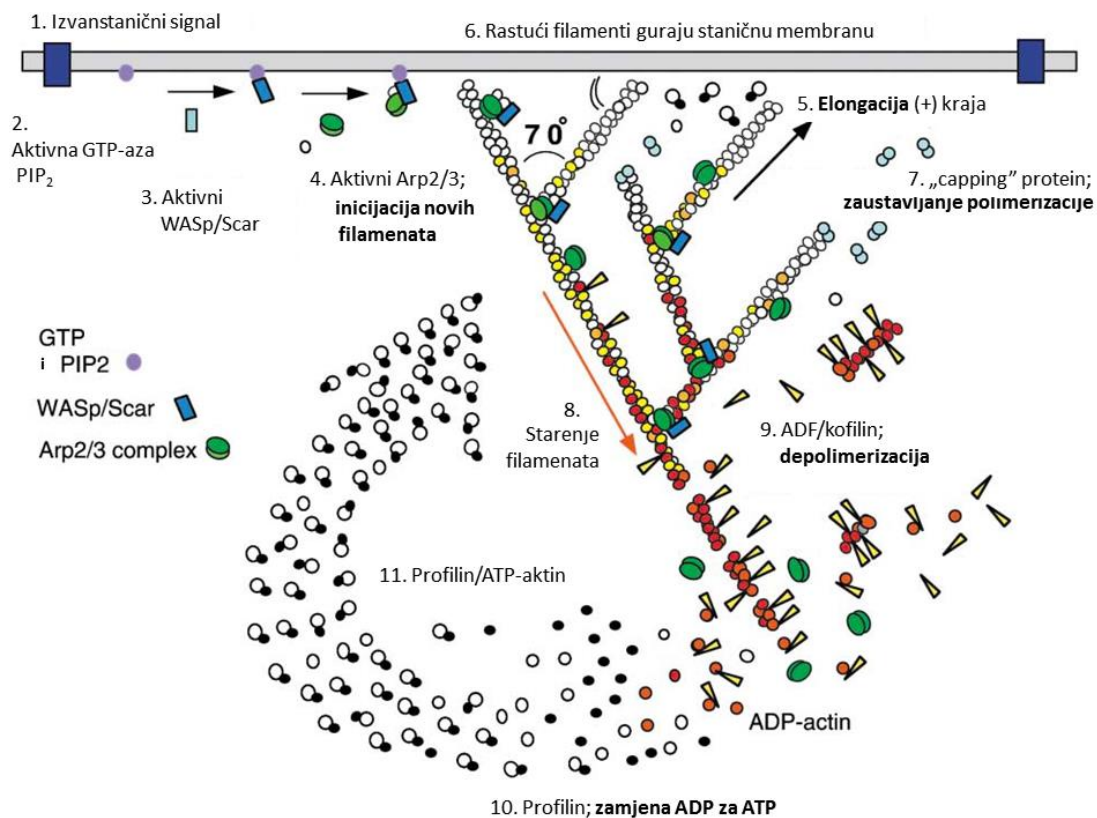
1.1.1. Molekularna osnova staničnog gibanja

Citoskelet eukariotske stanice održava strukturu stanice, omogućuje transport organela unutar stanice, a osim što osigurava njezinu čvrstoću i integritet, omogućuje i dinamične promjene oblika stanice te procese poput fagocitoze i stanične diobe (Pollard i Borisy, 2003). Stanični citoskelet čine tri grupe filamentoznih polimera: aktinska vlakna ili mikrofilamenti promjera 6 nm, intermedijarna vlakna promjera oko 10 nm i mikrotubuli promjera 24 nm (Howard, 2001). Aktinski citoskelet je glavna molekularna sastavnica gibanja eukariotskih stanica.

Aktin je najzastupljeniji protein u eukariotskim stanicama, u kojima se nalazi u obliku globularnog monomera, G-aktina, ili filamentoznog polimera, F-aktina (Ballestrem i sur., 1998). F-aktin se sastoji od dviju polimernih zavojnica sačinjenih od G-aktina i orijentiranih tako da daju polarnost filamentu. Polarnost aktinskih niti ključna je za mehanizam kojim se aktin polimerizira u stanici. Pozitivan (+) kraj filameta je brzorastući, dok je negativan (-) kraj filameta spororastući (Pollard i Mooseker, 1981). Spontano povezivanje aktinskih monomera je energetski nepovoljan proces, no uz pomoć proteina koji vežu monomere aktina i sudjeluju u procesu nastanka aktinskih početnica u sklopu procesa nukleacije, u stanici može doći do ubrzane polimerizacije aktina (Alberts i sur., 2002). Stopa elongacije proporcionalna je koncentraciji monomera aktina u citoplazmi (Carlier i sur., 1993). Unutar filamenata dolazi do hidrolize ATP-a vezanog za aktin, a nakon nekog vremena i do disocijacije γ -fosfata (Pollard i Borisy, 2003). Hidroliza ATP-a odvija se kroz nekoliko sekundi, dok za disocijaciju fosfata treba značajno dulje vrijeme te se za taj proces smatra da predstavlja sat koji mjeri kako dugo je pojedina aktinska jedinica vezana unutar filameta (Pollard i Borisy, 2003). Nukleacija aktinskih filamenata najčešće se odvija na membrani stanice pa je stoga i najveća gustoća aktinskih filamenata prisutna neposredno ispod površine stanice. Mreža aktinskih filamenata vezana za unutrašnji sloj stanične membrane naziva se korteks stanice, a ima funkciju u kontroli oblika stanice, pokretljivosti stanice i sposobnosti pričvršćivanja stanice za podlogu (Sackmann, 1994).

Protruzije na prednjem dijelu stanice nastaju polimerizacijom aktinskih filamenata koji pritom guraju staničnu membranu. Navedeni proces reguliran je širokim spektrom regulatornih molekula (dos Remedios i sur., 2003). Aktivirana

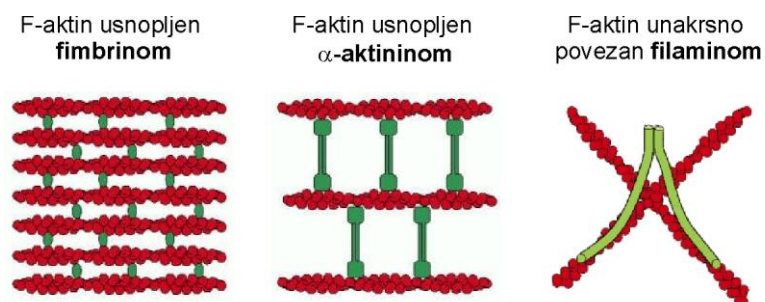
guanozin-trifosfataza koja pripada Rho (engl. *Ras homologous*) familiji proteina (Rho GTP-aza) i fosfatidilinozitol-4,5-difosfat (PIP₂) aktiviraju WASP/Scar (engl. *Wiskott-Aldrich syndrome protein/suppressor of cAMP receptor*) proteine koji dovode nukleirajući Arp2/3 (engl. *actin-related protein-2/3*) kompleks na bočnu stranu postojećeg aktinskog filameta (Goley i Welch, 2006; Steffen i sur., 2006). Rastući filamenti guraju staničnu membranu sve dok ne dođe do zaustavljanja polimerizacije vezanjem „capping“ proteina na rastući kraj filameta (Cooper i Schafer, 2000). Nakon hidrolize ATP-a unutar filameta i disocijacije fosfata može doći do vezanja kofilina koji usitnjava filamente ADP-aktina i pomaže disocijaciju aktinskih monomera s kraja filamenata (Bamburg, 1999). Profilin veže monomere aktina u citoplazmi i katalizira zamjenu ADP-a za ATP na njima, te ostaje vezan za monomere sve dok njihovim otpuštanjem ne započne novi ciklus polimerizacije (Kreis i Vale, 1998). Složena kontrola ovih procesa je neophodna, između ostaloga, i zato jer bi se pretjeranom polimerizacijom filamenata potrošila ograničena zaliha monomera aktina u stanici (Pollard i Borisy, 2003).



Slika 1.2. Regulacija polimerizacije aktinskih filamenata u blizini membrane stanice (prilagođeno prema Pollard i Borisy, 2003).

Predložen je model aktinskog filameta u kojem on funkcionira poput opruge koja se savija zbog termalnih fluktuacija (Mogilner i Oster, 1996). U trenutku kad je (+) kraj filameta udaljen od membrane dolazi do ugrađivanja aktinske podjedinice u međuprostor između filameta i stanične membrane, a time i do produljenja filameta. Kad se filament vrati u ravnotežni položaj, novo dodana podjedinica uzrokuje pritisak na membranu. Da bi polimerizacija aktina generirala silu koja uzrokuje ekstenziju membrane potrebno je da filamenti budu na neki način umreženi odnosno usidreni, a duljina dijela filameta od mjesta umreženja do polimerizirajućeg kraja trebala bi biti relativno mala u odnosu na duljinu perzistencije filameta (Pollard i Borisy, 2003).

Važnu ulogu u gibanju stanica imaju i proteini koji usnopljuju i/ili umrežuju aktinske filamente te ih na taj način dodatno učvršćuju i organiziraju u trodimenzionalne strukture (Rivero i sur., 1999; Winder i Ayscough, 2005). Tipični primjeri ovih proteina su fimbrin, α -aktinin, filamin i spektrin. Primjerice, fimbrin usnopljuje filamente u gusto zbijene snopove, dok α -aktinin usnopljuje filamente u razmaknutije strukture i na taj način omogućuje drugim proteinima da se vežu na filamente, poput miozina II koji potom sudjeluje u kontrakciji filamenata (Alberts i sur., 2002). Protein filamin umrežuje aktinske filamente otprilike pod kutom od 90° , a spektrin sudjeluje i u vezanju umreženih aktinskih filamenata za staničnu membranu (Alberts i sur., 2002). Na slici 1.3. uspoređene su strukture F-aktina povezanog fimbrinom, α -aktininom i filaminom.



Slika 1.3. Shematski prikaz filamenata aktina povezanih fimbrinom, α -aktininom i filaminom (prilagođeno prema *Alberts i sur., 2002*).

1.2. Različiti pristupi istraživanju staničnog gibanja

Istraživanju temeljnih procesa koji omogućuju gibanje stanica može se pristupiti na mikroskopskoj ili na makroskopskoj skali (Stossel, 1993). Mikroskopski se pristup u ovom slučaju odnosi na biokemijske i biofizičke analize makromolekula koje utječu na stanično gibanje, poput proteina uključenih u dinamiku aktinskog citoskeleta, dok se makroskopski pristup odnosi na promatranje gibanja stanica te analizu njihovih putanja. Osnovni korak u procesu ameboidnog staničnog gibanja je promjena oblika stanice i na toj razini dolazi do preklapanja mikroskopskog i makroskopskog pristupa (Hartman i sur., 1994). Promjene oblika stanice mogu se objasniti lokalnom razlikom unutarstaničnih sila koje nastaju kao rezultat biokemijskih procesa. Uloga pojedinog proteina u gibanju stanice može se ustanoviti ispitivanjem njegovog utjecaja na biofizikalne procese poput polarizacije stanice, ekstenzije i retrakcije membrane te vezanja za podlogu, ili, posljedično, njegovog utjecaja na putanju stanice.

Putanje stanica mogu se opisati pomoću matematičkih modela čiji parametri ovise o navedenim biofizikalnim procesima (Maheshwari i Lauffenburger, 1998). Matematički modeli koji se koriste u opisu gibanja stanica mogu biti mehanicistički ili fenomenološki. Mehanicistički modeli se oblikuju koristeći elemente biofizikalnih procesa koji uzrokuju gibanje stanice (npr. Xiong i sur., 2010), dok se fenomenološki modeli razvijaju na osnovi eksperimentalno izmjerenih veličina dobivenih analizom putanja stanica (Selmeczi i sur., 2005). Ne postoji, međutim, sasvim oštra granica između mehanicističkih i fenomenoloških modela gibanja stanica (Maheshwari i Lauffenburger, 1998).

Fenomenološki model gibanja stanica korišten u ovom radu razvijen je iz teorije Brownovog gibanja koja opisuje kretanje čestica malih dimenzija u fluidu (Lemons i Gythiel, 1997).

1.3. Kratak uvod u Brownovo gibanje i Langevinovu jednadžbu

Pojam Brownovog gibanja povezuje se sa zapažanjima Roberta Browna, iako je nepravilno kretanje čestica u tekućini koje je opisao Brown prethodno opaženo

ubrzo nakon pojave mikroskopa (Selmeczi i sur., 2008). Takvo se kretanje tada, međutim, smatralo isključivim svojstvom biološkog materijala. Robert Brown je početkom 19. stoljeća, osim sa česticama peludi, proveo eksperimente i s mjehurićima zraka unutar tekućine zarobljene u kristalima minerala te zaključio da je opaženo gibanje svojstveno i za anorgansku materiju. Slijedeći važan korak u razumijevanju Brownovog gibanja bila je publikacija Leona Gouya krajem 19. stoljeća, u kojoj je pokazao da Brownovo gibanje nije posljedica utjecaja vanjskih čimbenika poput razlike u temperaturi, svjetla, površinske napetosti i sl., već da se radi o svojstvu čestica fluida (Haw, 2002).

Einstein je početkom 20. stoljeća izveo jednadžbu za konstantu difuzije čestica suspendiranih u fluidu:

$$D = \frac{RT}{6\pi\mu r N_A} . \quad (1)$$

(Einstein, 1956). Tako definirana konstanta difuzije (D) u sebi sadrži konstantu idealnog plina (R), apsolutnu temperaturu (T), radijus čestice (r), viskoznost tekućine (μ) i Avogadrov broj (N_A) te na taj način povezuje fizikalnu veličinu koja opisuje sustav na makroskopskoj razini sa mikroskopskim svojstvima čestica. U procesu difuzije kretanje čestica opisuje se pomoću srednje kvadratne vrijednost pomaka (d) koji linearno ovisi o vremenu preko koeficijenta difuzije:

$$\langle d(t)^2 \rangle = 2Dt . \quad (2)$$

Zanimljivo je da je u isto to vrijeme Bachelier, istraživanjem kretanja vrijednosti dionica na tržištu, utvrdio da srednja kvadratna razlika vrijednosti dionica također ovisi linearno o vremenu (Haw, 2002).

Nekoliko godina kasnije Langevin je izveo jednadžbu Brownovog gibanja opisavši termalnu silu koja uzrokuje gibanje čestice kao nasumični šum (F_{random}), a njoj suprotnu silu koja je proporcionalna brzini čestice pomoću koeficijenta trenja ($6\pi\mu r$) iz Navier-Stokesove jednadžbe (Lemons i Gythiel, 1997):

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -6\pi\mu r \frac{dx}{dt} + F_{random} . \quad (3)$$

m je masa čestice, a $d^2 x/dt^2$ akceleracija.

1.4. Teorijski modeli gibanja stanica

Przibram je 1913. godine pokazao da trajektorije praživotinja (protozoa) u vodi slijede Brownovo gibanje te da srednji kvadrat pomaka stanica ovisi o vremenu promatranja tako da vrijedi

$$\langle d(t)^2 \rangle = 2n_{dim}Dt, \quad (4)$$

gdje n_{dim} predstavlja dimenziju prostora u kojem se odvija gibanje (Selmeczi i sur., 2008). Fürth je također proučavao gibanje protozoa, međutim, koristeći preciznija mjerenja, zamijetio je da stanice pokazuju sklonost kretanju u smjeru prethodnog pomaka te je u jednadžbu uveo vrijeme ustrajnosti (engl. *persistence time*). U izrazu

$$\langle d(t)^2 \rangle = 2n_{dim}D \left(t - P \left(1 - e^{-\frac{t}{P}} \right) \right) \quad (5)$$

P predstavlja vrijeme tijekom kojeg stanica „pamti“ prethodni smjer kretanja.

Ornstein je Langevinovu jednadžbu (3) formulirao na slijedeći način:

$$m \frac{d^2 x(t)}{dt^2} = -\beta \frac{dx(t)}{dt} + F(t), \quad (6)$$

gdje je $-\beta \dot{x}(t)$ poopćena sila trenja, a $F(t) = (2kBT\gamma)^{1/2} \eta(t)$ termalna sila statističkih svojstva normalno distribuiranog bijelog šuma (Ornstein, 1919). Fürthov empirijski izraz (5) je zapravo posljedica jednadžbe 6., koja se može zapisati i kao

$$P \frac{d^2 x(t)}{dt^2} = -\frac{dx(t)}{dt} + \sqrt{2D} \eta(t), \quad (7)$$

s time da je $P=m/\beta$. Potrebno je napomenuti da se jednadžba 5. može izvesti i iz nekih drugih teorijskih procesa (Selmeczi i sur., 2005).

U slučaju modeliranja gibanja stanica, članovi jednadžbe 6. nemaju svoje uobičajeno fizikalno značenje: masa stanice ne utječe na njeno kretanje, viskozno trenje je nebitno jer se stanica kreće pričvršćena za podlogu, a samo gibanje ne potiču termalne sile. Međutim, kao fenomenološki opis združenog djelovanja unutarstaničnih mehanizama, ovo je najjednostavniji matematički model staničnog gibanja. Ovako

opisano ustrajno nasumično gibanje (eng. *persistent random walk*) zove se Ornstein-Uhlenbeckov (OU) proces prema radu autora Uhlenbecka i Ornsteina iz 1930.

Gail i Boone (1970) prvi su okarakterizirali populaciju stanica pomoću parametara OU procesa. Analizirali su kretanje mišjih fibroblasta te odredili vrijednosti dva fenomenološka parametra: vremena ustrajnosti i difuzijske konstante populacije stanica. Od tih samih početaka stanično gibanje se uglavnom istraživalo u okviru teorije OU procesa (Dunn, 1983; Dunn i Brown, 1987; DiMilla i sur., 1992). Međutim, Hartman i suradnici (1994) primijetili su da se trajektorije humanih neutrofila ne mogu opisati samo lokalno usmjerenim, a globalno nasumičnim gibanjem, već pokazuju i određenu periodičnost. Shenderov i Sheetz (1997) također su kod stanica protista *D. discoideum* pokazali da njihovo gibanje posjeduje determinističku, periodičnu komponentu, te su predložili matematički model koji uvodi tu komponentu u Langevinovu jednadžbu:

$$\frac{dv(t)}{dt} = -\beta v(t) - \alpha \int_{-\infty}^t v(\tau) e^{-\gamma(t-\tau)} d\tau + F_{random}(t) . \quad (8)$$

Ovdje je β stopa smanjenja brzine, α je stopa memorije, a $1/\gamma$ karakteristično vrijeme memorije. Ideja periodičnosti u gibanju ima dodirnih točaka s konceptom ameboidnog gibanja kao cikličkog ponavljanja ekstenzije pseudopodija i kontrakcije uropodija.

1.4.1. Model korišten u ovom radu

Selmezi i suradnici (2005) su upotrebu proširene Langevinove jednadžbe (8) u modeliranju gibanja stanica opravdali na temelju različitih eksperimentalnih vrijednosti dobivenih analizom trajektorija stanica. Autori su predložili da se pri procjeni zadovoljava li određeni fenomen svojstva OU procesa (5) upotrijebi autokorelacija eksperimentalno dobivene vremenski ovisne brzine stanice. Autokorelacija brzine OU procesa trebala bi zadovoljavati slijedeću jednadžbu

$$\langle \vec{v}(t) \cdot \vec{v}(t + \tau) \rangle = \frac{2D}{P} \cdot e^{-\frac{\tau}{P}} \quad (9)$$

Osim toga, očekivana vrijednost akceleracije koja proizlazi iz OU procesa trebala bi biti linearno proporcionalna vektoru brzine

$$\left\langle \frac{d\vec{v}}{dt} \right\rangle_v = -\frac{\vec{v}}{P}, \quad (10)$$

a razlika između trenutne akceleracije i srednje vrijednosti akceleracije pri toj brzini trebala bi imati svojstvo bijelog šuma, neovisnog o vektoru brzine:

$$\frac{d\vec{v}}{dt} - \left\langle \frac{d\vec{v}}{dt} \right\rangle_v = \frac{\sqrt{2D}}{P} \vec{\eta}, \quad (11)$$

Međutim, autori izvješćuju da se autokorelacija eksperimentalno izmjerenih brzina fibroblasta ponaša kao suma dviju eksponencijalnih funkcija te da je srednja vrijednost akceleracije nelinearno ovisna o brzini. Uz navedeno, standardna devijacija akceleracije fibroblasta bila je ovisna o brzini, s time da su paralelna i okomita komponenta akceleracije imale različitu amplitudu. Autori stoga predlažu korištenje Langevinove jednadžbe proširene memorijskim članom (jednadžba 8.; Shenderov i Sheetz, 1997), dodatno uvodeći ovisnost pojedinih parametara modela o brzini:

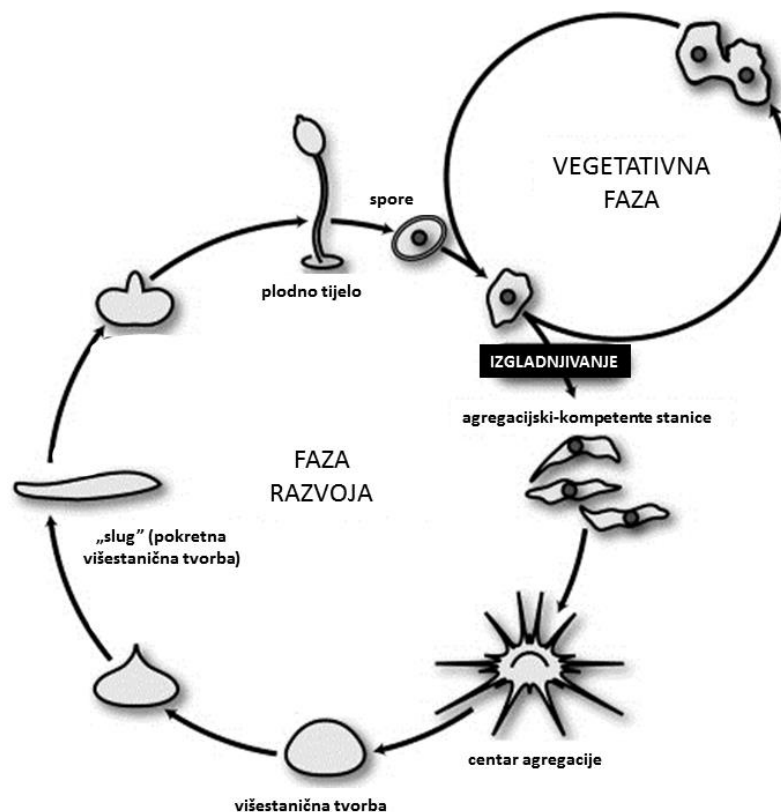
$$\frac{d\vec{v}(t)}{dt} = -\beta(v(t)) \cdot \vec{v}(t) + \alpha^2 \int_{-\infty}^t \vec{v}(\tau) \cdot e^{-\gamma(t-\tau)} d\tau + \sigma(\vec{v}(t)) \cdot \vec{\eta}(t). \quad (12)$$

$\beta(v)$ je stopa smanjenja brzine, α je stopa memorije, $1/\gamma$ je karakteristično vrijeme memorije, $\vec{\eta}$ je normalno distribuirani bijeli šum, a $\vec{\sigma}(\vec{v})$ je tenzor intenziteta šuma s paralelnom i okomitom komponentom u odnosu na smjer brzine. Ovaj model korišten je kasnije i za karakterizaciju gibanja stanica protista *D. discoideum* (Selmeczi i sur., 2008; Takagi i sur., 2008).

1.5. Protist *Dictyostelium discoideum* kao modelni organizam

Dictyostelium discoideum (Raper, 1935) je protist koji pripada „društvenim“ amebama (razred *Dictyostelia*). Za ovu skupinu jednostaničnih organizama karakteristično je da dio životnog ciklusa provode u obliku uvjetne višestaničnosti. Prirodno stanište protista *Dictyostelium discoideum* je šumsko tlo na kojem, u povoljnim uvjetima vlage i temperature, živi kao jednostanična ameba i hrani se bakterijama (Barišić i Weber, 2004). U nepovoljnim uvjetima, poput gladovanja ili suše, stanice *D. discoideum* prolaze kroz složene razvojne promjene, počinju lučiti

ciklički adenozin-monofosfat (cAMP) i migrirati prema tzv. agregacijskim centrima procesom kemotaksije, stvarajući pritom velike nakupine stanica. Ove nakupine sadrže i do 10^5 stanica, koje se s vremenom čvršće međusobno vežu te oko nakupina nastaje svojevrsna ovojnica (Fuchs i sur., 1993). Opisana višestanična tvorba (engl. *slug*) se zatim produljuje u visinu i pada bočno na podlogu, nakon čega počinje migracija, sada višestaničnog, organizma prema mjestu povoljnog osvjetljenja i temperature (Dormann i sur., 1996). U ovom stadiju dolazi do diferencijacije stanica te oko 20% njih bude predodređeno da postanu stalak rasplodnog tijela (stanice koje se većinom nalaze na prednjem dijelu; Maeda, 2011). Kad stigne do povoljnog mjesta, dio višestanične tvorbe se pričvršćuje za podlogu te nastaje stalak na čijem vrhu 80% stanica formira spore. Kada ponovno nastanu povoljni uvjeti, spore prolaze germinaciju i počinje novi ciklus protista *D. discoideum* kao jednostanične amebe. Opisani životni ciklus prikazan je na slici 1.4.



Slika 1.4. Životni ciklus protista *Dictyostelium discoideum* (prilagođeno prema Maeda, 2005).

D. discoideum jednostavno se uzgaja u laboratorijskim uvjetima i za istraživanje ovog organizma razvijen je veliki broj molekularno-genetičkih metoda (Eichinger, 2003). Stanice ovog protista su haploidne što omogućuje izravno povezivanje fenotipskih promjena s uvedenim mutacijama. Genom *D. discoideum* veličine 34 MB organiziran je u šest kromosoma, a značajan broj gena homologan je genima u višim eukariotima te se često koristi kao modelni organizam u biomedicinskim istraživanjima (Eichinger i sur., 2005; Müller-Taubenberger i sur., 2013; Williams i sur., 2006). Sposobnost kemotaksije stanica prema agregacijskim centrima, kao i njihovo gibanje u povoljnim uvjetima dok pretražuju podlogu za hranom, čini *D. discoideum* izvrsnim modelnim organizmom u istraživanju staničnog gibanja. Mnoge značajke gibanja stanica ovog protista slične su onima u stanicama sisavaca, bilo da se radi o komponentama aktinskog citoskeleta funkcionalno sačuvanim kroz čitavu domenu eukariota ili o karakteristikama koje se očituju u načinu kretanja stanice (Friedl i sur., 2001). Neutrofilni su, poput stanica *D. discoideum*, vrlo dinamični i postižu brzine preko 10 $\mu\text{m}/\text{min}$, tako da u minuti mogu preći duljinu vlastitog tijela. Također, u izotropnoj okolini kreću se neusmjereno, no kada se nađu u gradijentu kemoatraktanta brzo se orijentiraju i kreću prema njegovom izvoru (Parent, 2004).

Kao i neki tipovi stanica sisavaca koje se gibaju ameboidno, stanice protista *D. discoideum* imaju sposobnost usmjerenog gibanja prema pojedinim kemoatraktantima. U vegetativnoj fazi životnog ciklusa, dok stanice žive i razmnožavaju se kao jednostanične amebe, prilikom pretraživanja okoline u svrhu pronalaska hrane stanice reagiraju na gradijent folne kiseline, koju luče bakterije, te ih na taj način pronalaze (Pan i sur., 1972; Segall i sur., 1987; Srinivasan i sur., 2013). Kad ponestane hrane u okolini, stanice počinju lučiti cAMP i prolaziti kroz složene razvojne promjene. U ovoj, agregacijski kompetentnoj, fazi životnog ciklusa stanice se usmjeravaju prema gradijentu cAMP-a te se na taj način nakupljaju tvoreći agregacijske centre. Kako bi se istražili temeljni mehanizmi koji omogućuju i oblikuju stanično gibanje, samo gibanje stanice često se istražuje u homogenoj i izotropnoj okolini bez prisustva vanjskih signala (Li i sur., 2008).

1.6. Kvaziperiodičnost u gibanju stanica protista *D. discoideum*

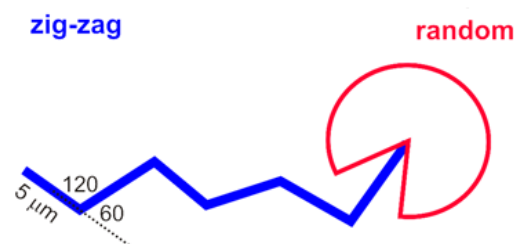
Autori Shenderov i Sheetz (1997) proučavali su neusmjereno gibanje agregacijski kompetentnih stanica *D. discoideum* te zamijetili da se periodi ustrajnog kretanja izmjenjuju s periodima nasumičnog gibanja i malom translokacijom. Autori zaključuju da su periodi male translokacije stanica povezani s neposredno završenim izduženjem pseudopodija i/ili kontrakcije stanice te predlažu da samo tijekom navedenog vremenski kratkog „mirovanja“ može doći do reorijentacije stanice. Analizom autokorelacije amplitude brzine i autokorelacije promjene kuta gibanja autori dolaze do zaključka da promatrane stanice imaju urođenu periodičnost, s periodima od oko jedne do tri minute.

Li i suradnici (2008) usporedili su trajektorije stanica *D. discoideum* s trajektorijama simuliranim različitim modelima nasumičnog gibanja, te su utvrdili da stanice *D. discoideum* u istom vremenu pretraže veću površinu od navedene artificijelne konkurencije. S obzirom da je molekularna mašinerija gibanja eukariotskih stanica ostala sačuvana tijekom evolucije, autori predlažu da i u drugim stanicama eukariota ovako regulirano gibanje postoji u svrhu uspješnijeg pronalaska izvora hrane ili signala. Stanice promatrane u navedenom radu pokazuju sposobnost ustrajnosti do oko 10 minuta, nakon čega gube prethodni smjer gibanja, a tijekom cijelog razdoblja ustrajnog gibanja kreću se naizmjenično skrećući lijevo pa desno, prateći generalno smjer gibanja. Te naizmjenične, kratke promjene smjera događaju se u prosjeku svakih jednu do dvije minute. Autori navode da dugo vrijeme ustrajnosti može pomoći stanicama u fazi razvoja, kad počinju lučiti cAMP i kretati se prema centrima agregacije. Valovi cAMP kreću se spiralno oko započetog centra agregacije te signal (cAMP) dolazi do stanica u pulsovima, svakih 6 do 10 minuta (Goldbeter, 2006; Maeda i sur., 2004; Tyson i Murray, 1989). Uz dovoljno dugo vrijeme očuvanja smjera, stanice se tako mogu nastaviti gibati usmjereno prema centru agregacije i u razdobljima između pulsova.

Takagi i suradnici (2008) su analizom srednjeg kvadratnog pomaka stanica utvrdili da u gibanju agregacijski kompetentnih stanica postoje tri različite vremenske skale u gibanju: prva od nekoliko sekundi, druga od nekoliko minuta i treća od oko 10 minuta. U gibanju vegetativnih stanica očituju se samo prve dvije vremenske skale. Osim toga, brzina i ustrajnost gibanja postaju sve veće kako stanice ulaze dalje u fazu

razvoja. Za karakterizaciju gibanja stanica koristili su i Langevinovu jednadžbu gibanja proširenu memorijskim članom, te su ustvrdili da se stopa smanjenja memorije smanjuje tijekom faze razvoja (iz vegetativnih u agregacijski kompetentne stanice), tj. da karakteristično vrijeme pamćenja smjera kretanja postaje dulje. Nasuprot tomu, stopa memorije odnosno udio memorijskog člana u ukupnoj akceleraciji stanica se smanjuje.

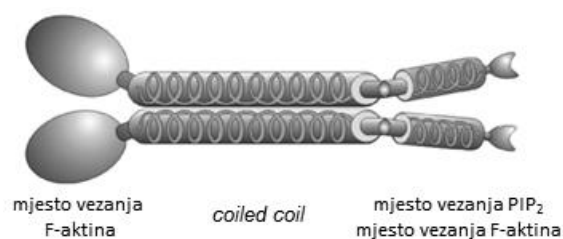
Autori Bosgraaf i Van Haastert (2009) istraživali su dinamiku pseudopodija tijekom gibanja agregacijski kompetentnih stanica *D. discoideum* te ustvrdili da je prosječno vrijeme između nastanka dva pseudopodija oko 15 sekundi, međutim 60% njih se ne pričvrsti za podlogu te se povlači natrag i ne dolazi do pomaka stanice. Prosječno vrijeme između pseudopodija koji se pričvrste na podlogu i utječu na pomak stanice je oko 30 sekundi. Autori su klasificirali nastale pseudopodije kao razlomljene („*split*“) pseudopodije ukoliko nastaju u neposrednoj blizini prethodnog pseudopodija, i nove („*de novo*“) pseudopodije ukoliko nastaju na prethodno neaktivnom dijelu stanične membrane. Stanica se, u prosjeku, kreće slijedom od šest „*split*“ pseudopodija koji alterniraju lijevo/desno nakon čega slijedi jedan „*de novo*“ pseudopodij. Drugim riječima, stanica u prosjeku svakih tri minute promijeni smjer gibanja. Zaključak autora je da *split* pseudopodiji čine gibanje usmjerenim, dok „*de novo*“ pseudopodiji omogućuju promjenu smjera. Ustrajnost stanice na taj način ovisi o omjeru nastalih „*split*“ i „*de novo*“ pseudopodija.



Slika 1.5. Shematski prikaz periodičnog gibanja stanice prema Bosgraaf i Van Haastert, 2009: tipična stanica svakih 30 sekundi skreće naizmjenično lijevo/desno pod kutom od $\sim 60^\circ$, a nakon tri minute pod nasumičnim kutom mijenja smjer gibanja.

1.7. Korteksilin I i II u stanicama protista *D. discoideum*

Proteini korteksilin I i korteksilin II su pripadnici α -aktinin/spektrin superfamilije proteina, koji imaju karakteristični motiv za vezanje F-aktina. Pripadnici ove superfamilije imaju funkciju u povezivanju i umrežavanju aktinskih filamenata, a za korteksiline je specifično da djeluju u obliku paralelnih homodimera ili, preferencijalno, heterodimera (Faix i sur., 1996). Korteksilin I sastoji se od 444 aminokiseline, a korteksilin II od 441 aminokiseline i međusobno su 60% identični, s time da je sličnost dva korteksilina veća u N-terminalnom kraju gdje im je 73% sekvence identično (Faix i sur., 1996). N-terminalna domena posjeduje sličnosti s humanim α -aktininom i β -spektrinom, dok je C-terminalna domena strukturom najbližnja krajevima miozina (Faix i sur., 1996). Na C-terminalnom kraju korteksilina nalazi se karakteristična struktura dvije međusobno svijene paralelne α -zavojnice (engl. *coiled coil*) koje omogućuju paralelno povezivanje korteksilina (Faix, 2002; Steinmetz i sur., 1998). Stock i suradnici (1999) utvrdili su da i N- i C-terminalna domena korteksilina I sadrži mjesto vezanja aktina, ali C-terminalna domena ima daleko jaču aktivnost usnopljavanja aktinskih filamenata. Osim toga, na C-terminalnom kraju nalazi se i mjesto za vezanje fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PIP₂) koji svojim vezanjem suprimira usnopljavajuću aktivnost korteksilina (Stock i sur., 1999). Struktura korteksilina I shematski je prikazana na slici 1.6.

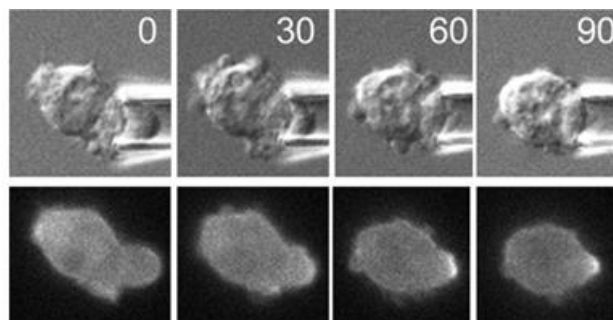


Slika 1.6. Shematski prikaz homodimera korteksilina I (prilagođeno prema Faix, 2002).

1.7.1. Uloga korteksilina u čvrstoći staničnog korteksa i citokinezi

U stanicama protista *D. discoideum* korteksilini se tijekom interfaze nalaze pretežno u korteksu stanice (od tuda potječe njihov naziv; Faix i sur., 1996), gdje usnopljavanjem i umrežavanjem aktinskih filamenata osiguravaju viskoelastičnost stanične ovojnice (Simson i sur., 1998; Girard i sur., 2004), dok tijekom mitoze prelaze u ekvatorijalnu ravninu stanice gdje sudjeluju u tvorbi diobene brazde (Weber i sur., 1999; Girard i sur., 2004).

Ren i suradnici (2009) predložili su mehanizam u kojem korteksilin I i miozin II kooperativno sudjeluju u prijenosu mehaničkih podražaja unutar stanice u svrhu očuvanja oblika stanice tijekom citokineze. Prilikom kontrolirane deformacije stanice u diobi pomoću usisne mikropipete, miozin II i korteksilin I nakupljali su se u dijelovima korteksa čiji je oblik bio promijenjen utjecajem vanjske sile (primjer na slici 1.7.). Međutim, u stanicama deficitarnim za miozin II nije dolazilo do nakupljanja korteksilina I, niti je u stanicama deficitarnim za korteksilin I dolazilo do nakupljanja miozina II u deformiranim dijelovima korteksa (Ren i sur., 2009).



Slika 1.7. Nakupljanje korteksilina I u dijelovima stanice mehanički deformiranim usisnom mikropipetom (preuzeto iz Ren i sur., 2009).

Zanimljivo je da je *in vitro* ispitivanjem kontraktilnih mreža aktinskih filamenata ustanovljeno da prvo dolazi do kontrakcije aktinskih filamenata pomoću filamentoznog miozina II, a zatim do stabilizacije u guste kontrahirane nakupine pomoću korteksilina I (Köhler i Bausch, 2012).

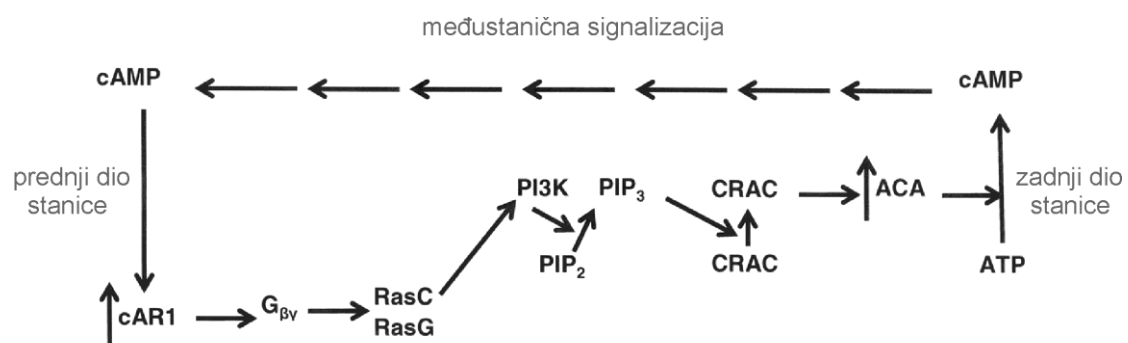
Za razliku od navedenog, međusobno ovisnog, nakupljanja miozina II i korteksilina I u korteksu deformiranog dijela stanice, njihovo nakupljanje u diobenoj brazdi odvija se naizgled neovisno (Weber i sur., 1999). U myoII stanicama korteksilin se pravilno smješta u centralnu regiju, i to u većoj koncentraciji nego u stanicama divljeg tipa, međutim, u nedostatku miozina II ne dolazi do stabilizacije diobene brazde depozicijom filamentoznog miozina II što kao posljedicu može imati asimetričnu diobu (Weber i sur., 2000). Ako je asimetrija tolika da jedna od stanica kćeri ostane bez jezgre, u dijelu stanice bez jezgre dolazi do nakupljanja korteksilina i snažne kontrakcije, što podsjeća na djelovanje miozina u stražnjem dijelu stanice tijekom kontrakcije u procesu staničnog gibanja (Moore i sur., 1996; Weber i sur., 2000).

Nedostatak oba korteksilina u stanici *D. discoideum* uvelike smanjuje umreženost aktinskih filamenata te stanice postaju znatno plosnatije od stanica divljeg tipa (Faix i sur., 1996). Stanice ovog soja su velike, plosnate, naboranih rubova, a dijelovi stanica često su povezani tankim citoplazmatskim mostovima. Aktinski filamenti se ipak do neke mjere umrežuju jer stanice i dalje imaju mogućnost kontrakcije, smanjenja površine i stvaranja protruzija na membrani, što je vjerojatno omogućeno aktivnošću drugih proteina koji povezuju i umrežuju F-aktin, poput α -aktinina ili proteina ABP-120 (Faix i sur., 1996; Reichl i sur., 2008; Witke i sur., 1992). Stanice kojima nedostaju oba korteksilina ne prolaze kroz normalnu staničnu diobu. Razlog tome je što u stanicama dolazi do mitoze, ali bez odgovarajuće citokineze, odnosno odvajanja stanica kćeri (Faix i sur., 1996). Kao posljedica nastaju velike stanice s različitim brojem jezgri, od kojih neke dosegnu i do 100 jezgri po stanici prije nego odumru. Promjene morfologije stanica i nepravilna dioba izraženi su, iako u manjoj mjeri, i u mutantima pojedinačnih korteksilina, nešto više u stanicama kojima nedostaje korteksilin I (Faix i sur., 1996).

1.7.2. Uloga korteksilina u kemotaksiji stanica

Shu i suradnici (2012) pokazali su da kod stanica deficitarnih za korteksiline I i II ne dolazi do tipičnog kolektivnog kretanja prilikom agregacije, tzv. *head-to-tail streaming*, te da stanice u razvoju formiraju male agregate koji se dalje ne razvijaju u plodna tijela. U stanicama divljeg tipa prilikom vezanja cAMP-a na transmembranski

receptor cAR1 (engl. *cyclic AMP receptor 1*), koji se nadalje veže za heterotrimerni G-protein, dolazi do oslobađanja $G_{\beta\gamma}$ podjedinice koja aktivira RasC i RasG proteine (Shu i sur., 2012). Ras (engl. *rat sarcoma*) proteini zatim aktiviraju fosfatidilinozitol-3 kinazu (PI3K) koja katalizira konverziju PIP_2 u PIP_3 , koji dalje potiče nakupljanje aktina i njegovu polimerizaciju u prednjem dijelu stanice (Bolourani i sur., 2006; Sasaki i sur., 2004). Osim toga, protein CRAC (engl. *cytosolic regulator of adenyl cyclase*) se veže za PIP_3 i aktivira adenilil ciklazu A (ACA), što finalno rezultira otpuštanjem cAMP-a sa zadnjeg kraja stanice, odnosno prijenosom cAMP signala drugim stanicama u okolini (Insall i sur., 1994). Shema opisanog odgovora stanice na kemoatraktant prikazana je na slici 1.8. U stanicama deficitnim za korteksiline prilikom stimulacije cAMP-om iz točkastog izvora poput mikropipete dolazi do inhibicije sinteze proteina cAR1 i ACA te do smanjene aktivacije proteina ACA, RasC i RasG, odnosno općenito do inhibicije molekularnog odgovora stanice na ekstracelularni cAMP (Shu i sur., 2012). Autori navode da nakon transformacije stanica s aktivnom ACA, njihov razvojni fenotip postaje sličan fenotipu divljeg tipa – nastaju nakupine normalne veličine i dolazi do razvoja plodnog tijela – te predlažu da je glavni razlog neuspjelog razvoja populacije stanica u plodno tijelo inhibicija sinteze ACA što rezultira nemogućnošću pojačavanja signala u međustaničnoj cAMP signalizaciji.



Slika 1.8. Shema prijenosa cAMP signala tijekom kemotaksije (prilagođeno prema Shu i sur., 2012).

Primijećeno je da stanice kojima nedostaju korteksilini imaju povećani udio nastanka bočnih pseudopodija prilikom kemotaksije, odnosno slabiju usmjerenost, što ukazuje na to da korteksilini imaju utjecaj u inhibiciji nastanka pseudopodija, odnosno

njihovom prostornom ograničavanju na prednji dio stanice (Cha i sur. Jeon, 2011; Jeon i sur., 2007; Lee i sur., 2010; Shu i sur., 2012).

1.7.3. Kompleks korteksilina s malom GTP-azom Rac1A i proteinom DGAP1

Faix i suradnici (2001) pokazali su da dimeri korteksilina unutar stanice tvore tetramerni kompleks s aktivnim oblikom Rho GTP-aze Rac1A te s proteinom DGAP1 ili s proteinom GAPA. DGAP1 i GAPA su proteini srodni proteinima familije IQGAP, koji pripadaju porodici proteinskih skela (engl. *scaffolding proteins*), a u stanicama sisavaca imaju ulogu u procesima vezanim za dinamiku aktinskog citoskeleta, poput polarizacije stanice, adhezije na podlogu, fagocitoze i staničnog gibanja (Shannon, 2012). U stanicama *D. discoideum* protein DGAP1 lokaliziran je u korteksu interfaznih stanica, a tijekom mitoze prelazi u diobenu brazdu gdje sudjeluje u njezinoj inicijaciji (Faix i sur., 2001). Stanice kojima nedostaje DGAP1 imaju povećanu brzinu kretanja, više koncentracije F-aktina te više filopodija i nabora na membrani od stanica divljeg tipa, dok stanice sa prekomjernom ekspresijom DGAP1 imaju manje ekstenzija na membrani i kreću se sporije (Faix i sur., 1998). Faix i suradnici (2001) pokazali su da se u spomenutom tetramernom kompleksu u stanicama divljeg tipa nalazi uglavnom DGAP1, ali tek eliminacijom i DGAP1 i GAPA dolazi do poremećaja u citokinezi slično kao i kod dvostrukog korteksilinskog mutanta. Lee i suradnici (2010) navode da u kompleksu mogu biti DGAP1 ili GAPA (Mondal i sur., 2010), bilo koji dimer korteksilina (uključujući i korteksilin III; Liu i sur., 2014), te Rac1A, B ili C.

Filić i suradnici (2012) predložili su da Rac1A ostaje dugotrajno vezan unutar navedenog kompleksa, te tetramerni kompleks DGAP1/dimer korteksilina/Rac1A na taj način služi kao svojevrsni inhibitor ostalih funkcija proteina Rac1A. Vežanje Rac1A u tetramerni kompleks tako sprječava interakciju Rac1A sa Scar/WAVE kompleksom koji preko Arp2/3 kompleksa aktivira polimerizaciju F-aktina i nastanak pseudopodija (Filić i sur., 2014, 2012). Odvojena lokalizacija Arp2/3 kompleksa i tetramernog kompleksa korteksilina potvrđena je i u istraživanju valova polimerizacije aktina koji nastaju u dijelu stanice pričvršćenom uz podlogu (Schroth-Diez i sur., 2009).

1.8. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati potencijal fenomenološkog Langevinovog modela gibanja proširenog memorijskim članom u razumijevanju molekularnih mehanizama koji reguliraju proces kretanja eukariotskih stanica. U tu svrhu analizirano je kretanje stanica protista *D. discoideum* deficijentnih za proteine korteksilin I i korteksilin II, koji sudjeluju u usnopljavanju aktinskih filamenata i organizaciji snopova u trodimenzionalne mreže. Stanice su promatrane u dvije različite faze životnog ciklusa – vegetativnoj fazi i agregacijski kompetentnoj fazi. Parametri modela gibanja stanica soja deficijentnog za korteksiline uspoređeni su s parametrima stanica divljeg tipa te je na taj način određen utjecaj izmjene molekularnog sastava aktinskog citoskeleta na parametre navedenog modela.

Drugi cilj istraživanja bio je istražiti moguću heterogenost pojedinih sojeva u različitim fazama razvojnog ciklusa s obzirom na način kretanja. U tu svrhu su metodama nenadziranog učenja (engl. *unsupervised learning*) stanice iste biološke populacije razvrstane u podskupine na osnovi individualnih karakteristika gibanja. Za svaku tako dobivenu podskupinu stanica određeni su parametri Langevinovog modela gibanja proširenog memorijskim članom.

2. Materijali i metode

2.1. Rad s kulturama stanica protista *D. discoideum*

2.1.1. Korišteni sojevi

Soj AX2 je laboratorijski divlji tip razvijen 1970-ih iz prvog izoliranog soja protista *D. discoideum*, NC4 (Raper, 1935). AX2 je aksenični soj (AX, iz engl. *axenic*), što znači da može preživjeti u laboratorijskim uvjetima pinocitozom hranjivih tvari iz medija. Uz AX2, kao divlji tip, korišten je korteksilin I/II dvostruki mutant (CI/CII). Ovaj soj konstruiran je iz AX2 soja sekvencijalnom disrupcijom *ctxA* i *ctxB* gena (Faix i sur., 1996).

2.1.2. Uzgoj stanica

Stanice *D. discoideum* soja AX2 i CI/CII uzgajane su u Petrijevim posudama promjera 9 cm u 10 mL AX medija (tablica 1.) pri 22°C. Pri ovim uvjetima stanice su pričvršćene za plastično dno posude i hrane se pinocitozom. Generacijsko vrijeme ovako uzgajanih stanica je oko 8 sati za soj AX2 te oko 12 sati za soj CI/CII.

SASTOJAK	KONCENTRACIJA
pepton	14,3 g/L
ekstrakt kvasca	7,15 g/L
maltoza	18 g/L
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	1,238 g/L
KH ₂ PO ₄	0,486 g/L
ampicilin	50 µg/mL
streptomycin	40 µg/mL
* G-418 (neomicin)	10 µg/mL
* blasticidin S	10 µg/mL

Tablica 2.1. Sastav AX hranjivog medija, pH 6.7.

* Za selekciju stanica soja CI/CII.

Stanice su, uz svakodnevnu izmjenu medija, uzgajane u kulturi do postizanja subkonfluentnosti ($\sim 1 \times 10^6$ st/mL) za što je potrebno otprilike dva dana za AX2 stanice te tri dana za CI/CII stanice. Nakon dostizanja subkonfluentnosti, oko 1×10^4 stanica prebačeno je u novu Petrijevu posudu sa svježim medijem. Kako bi se izbjeglo stvaranje spontanih mutacija, stanice iz ovako održavane kulture korištene su samo tijekom tri tjedna. Nakon toga bi se pokrenula nova kultura iz zaliha prethodno pripremljenih i pohranjenih spora na -80°C (soj AX2) ili stanica u tekućem dušiku (soj CI/CII).

2.1.3. Trajne kulture stanica

Subkonfluentno izrasle stanice soja AX2 isprane su fosfatnim puferom (17 mM Na-K-fosfatni pufer, pH 6.0) te u njemu centrifugirane tijekom 2 minute (pri 500 g na 4°C). Talog koji sadrži stanice resuspendiran je u 1 mL fosfatnog pufera te prebačen u Petrijevu posudu presvučenu fosfatnim agarom. Nakon formiranja rasplodnih tijela, što traje 2 do 3 dana, sakupljene su spore te su u 1 mL fosfatnog pufera pohranjene na -80°C . Stanice soja CI/CII ne tvore plodna tijela, odnosno nemaju mogućnost sporulacije. Zbog toga ih je potrebno sačuvati u fazi rasta dok postoje kao jednostanične amebe. Subkonfluentno izrasle stanice centrifugirane se tijekom 4 minute (pri 500 g na 4°C). Niska temperatura potrebna je za usporavanje staničnih procesa, kako bi se spriječilo oštećenje stanica, te se na dalje sve radi na ledu. Talog stanica resuspendiran je u 1 mL AX medija koji sadrži 2% dimetil-sulfoksida (DMSO). DMSO je krioprotektant koji sprječava oštećenje stanica tijekom daljnjeg procesa smrzavanja. Na resuspendirani talog je zatim, svakih nekoliko minuta, dodavan DMSO do konačne koncentracije 10% DMSO-a u AX mediju. Na ovaj način pripremljene stanice držane su 15 minuta na ledu, zatim dva sata na -20°C te dva dana na -80°C . Stanice su naposljetku pohranjene u tekućem dušiku.

Spore soja AX2 pohranjenog na -80°C vraćene u hranjivi medij na prikladnoj temperaturi vrlo brzo germiniraju. Stanicama soja CI/CII pohranjenim u tekućem dušiku potrebno je posvetiti više pažnje. Važno je da se stanice što prije i na što nižoj temperaturi oslobode DMSO-a koji je pri normalnom metabolizmu stanice mnogo opasniji. Stanice soja CI/CII iz tekućeg dušika prebačene su u 30 mL ohlađenog AX medija, na način da je dio stanica još uvijek u kristalu leda. Stanice su centrifugirane tijekom 2 minute (pri 500 g na 4°C), a talog resuspendiran u 10 mL AX medija.

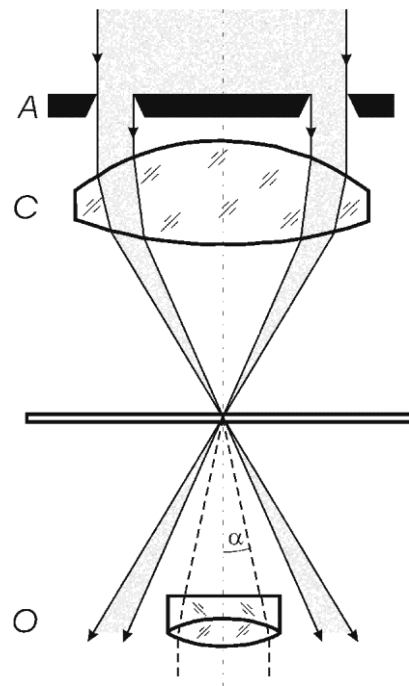
2.1.4. Inducirani prelazak stanica *D. discoideum* u fazu razvoja

Kad su stanice dosegle konfluentnost ($\sim 3 \times 10^6$ st/mL) isprane su dva puta sa po 10 mL fosfatnog pufera te ostavljene u 10 mL fosfatnog pufera u Petrijevim posudama tijekom idućih 6 sati (AX2) ili 8 sati (CI/CII).

2.2. Mikroskopija stanica

Mikroskopija tamnog polja je tehnika kod koje zrake svjetla koje prolaze kroz uzorak ne ulaze direktno u objektiv, već se u objektivu detektira samo svjetlo koje je raspršeno ili difraktirano na promatranom uzorku. Slike dobivene mikroskopijom tamnog polja karakteristično imaju tamnu pozadinu na kojoj se vide svijetli objekti u uzorku. Visoki kontrast navedenih slika omogućuje njihovu automatsku digitalnu analizu pomoću programa primarno razvijenih za analizu slika dobivenih fluorescencijskom mikroskopijom. Prednost nad fluorescencijskom mikroskopijom je ta što svjetlost korištena u mikroskopiji tamnog polja tipično nije štetna za stanice jer je manjeg intenziteta i raspona valnih duljina od 390 do 750 nm, pa se ovom metodom može pratiti gibanje stanica kroz duži vremenski period bez utjecaja na promatrane stanice.

Za potrebe praćenja kretanja stanica u ovom radu osmišljena je konfiguracija za mikroskopiju tamnog polja realizirana pomoću standardnih komercijalnih komponenti svjetlosnog mikroskopa Zeiss Axiovert 135: kondenzora za mikroskopiju faznog kontrasta i objektivna male numeričke aperture (Antolović i sur., 2014). Kondenzor velike radne duljine opremljen anularnom aperturom prilagođenom za tehniku faznog kontrasta propušta šuplji stožac svjetla koji pada na uzorak pod kutovima koji odgovaraju numeričkoj aperturi kondenzora 0.34 – 0.5. Uz navedeni kondenzor korišten je objektiv povećanja $5\times$ i male numeričke aperture $NA = 0.15$. Shematski prikaz opisane konfiguracije za mikroskopiju tamnog polja nalazi se na slici 2.1. Kao izvor svjetla korištena je halogena lampa (100 Hal - 12 V, 100 W; Carl Zeiss) s pojasno propusnim crvenim filterom (HQ 620/60 nm). Uz minimalnu jakost svjetla, a koja omogućuje dovoljan kontrast slike, navedene valne duljine osvjetljenja izabrane su kako bi se smanjio utjecaj svjetla na stanice (Häder i sur., 1983). Optička rezolucija mikroskopa određena je mjerenjem radijalnog profila intenziteta u slikama 10 kuglica veličine 200 nm (*TetraSpeck*TM, Invitrogen) i iznosi $2.74 \pm 0.04 \mu\text{m}$.



Slika 2.1. Shematski prikaz konfiguracije za mikroskopiju tamnog polja (prilagođeno prema *Pluta, 1989*). Svjetlo koje izlazi iz anularne aperture “A” fokusira se pomoću kondenzora “C”, a svjetlo raspršeno na uzorku ulazi u objektiv “O”, numeričke aperture $NA = \sin\alpha$. Svjetlo koje prolazi kroz uzorak bez raspršenja ne ulazi u objektiv.

Slike vidnog polja dimenzija $1.3 \text{ mm} \times 0.9 \text{ mm}$ spremene su svake dvije sekunde tijekom dva sata putem CCD kamere (Sony XC-75CE) povezane na računalo, pomoću računalnog softvera prethodno razvijenog u laboratoriju. Rezolucija snimljenih slika je $1.67 \text{ }\mu\text{m/pixel}$.

Otpriblike 5×10^3 subkonfluentnih stanica prebačeno je u 1 mL AX medija (vegetativne stanice), odnosno 1 mL fosfatnog pufera (agregacijski kompetentne stanice) u plastični prsten promjera 1.8 cm koji je prethodno pričvršćen na staklenu pokrovnicu. Stanice su zatim ostavljene tijekom sat vremena kako bi se pričvrstile za podlogu. Tijekom ovog perioda, kao i za vrijeme snimanja, stanice se nalaze u vlažnoj atmosferi pri 22°C . Koncentracija stanica na podlozi tijekom snimanja iznosila je $\sim 15 \text{ stanica/mm}^2$. Hranjivi mediji i puferi korišteni u ovu svrhu prethodno su filtrirani kako bi se minimaliziralo raspršenje svjetla na česticama nečistoća iz otopine.

2.3. Analiza filmova

Trajektorija stanice je vremenski slijed položaja geometrijskog centra stanice, takozvane centroide. U svrhu određivanja trajektorija, snimljene sekvence slika analizirane su u programskom paketu za analizu slika ImageJ, pomoću računalnog modula Mosaic ParticleTracker 2D/3D (Sbalzarini i Koumoutsakos, 2005). Navedeni računalni modul omogućuje automatsku detekciju trajektorija čestica u vremenskim serijama slika. Korisnički parametri za optimizaciju detekcije čestice na podlozi su: predviđeni radijus čestice („*radius*“), gornji percentil distribucije intenziteta piksela slike („*percentile*“) koji određuje granicu iznad koje su pikseli prihvaćeni kao mogući dio čestice, te prag vrijednosti ciljne funkcije za diskriminaciju netipičnih čestica („*cutoff*“). Navedeni parametri prilagođavani su svakom pojedinom eksperimentu, ovisno o intenzitetu osvjetljenja i drugim uvjetima, a tipično su bili slijedećih raspona: *radius* 8-14, *percentile* 0.2-0.7 te *cutoff* 0. Korisnički parametri za optimizaciju povezivanja položaja čestica iz slijednih slika u trajektorije su: najveća moguća duljina pomaka čestice („*displacement*“) te prag tolerancije izostanka signala centroide kroz određeni broj slika („*link range*“).

Dobivene trajektorije odabrane su za daljnju analizu ukoliko su zadovoljavale slijedeći uvjet: praćene su neprekidno minimalno 40 minuta, a tijekom vremena praćenja nisu bile u dodiru s drugim stanicama niti u interakciji sa zaostalim česticama medija na podlozi.

2.4. Analiza trajektorija

Analiza trajektorija napravljena je u programskom paketu *Mathematica*. Položaj stanice i u vremenu t definiran je kao

$$\vec{p}_i(t) = \{x_i(t), y_i(t)\}$$

te je trajektorija stanice i definirana s

$$\vec{p}_i = \{\vec{p}_i(t_0), \vec{p}_i(t_1), \dots, \vec{p}_i(t_n)\}, \quad t_n = n \cdot \Delta t, \quad \Delta t = 2 \text{ s.}$$

Pomak stanice i u vremenu t definiran je s

$$\vec{d}_i(t) = \vec{p}_i(t + \Delta t) - \vec{p}_i(t),$$

a trenutna brzina stanice (engl. *instantaneous speed*) s

$$\vec{v}_i(t) = \frac{\vec{d}_i(t)}{\Delta t} .$$

Srednji kvadratni pomak za pojedinu populaciju stanica definiran je kao

$$\langle \delta(\tau)^2 \rangle = \langle (\vec{p}_i(t + \tau) - \vec{p}_i(t))^2 \rangle_{t,i} .$$

S obzirom da se korišteni model gibanja stanica osniva na pretpostavci da je okolina stanice izotropna te konstantna u vremenu, potrebno je bilo provjeriti uvjete svakog eksperimenta. U svrhu provjere prostorne izotropnosti promatrana je superpozicija svih trajektorija pojedinog eksperimenta, a za provjeru stalnosti u vremenu praćene su promjene srednje brzine populacije stanica tijekom trajanja eksperimenta.

Za daljnju analizu izabrane su trajektorije praćene točno 40 minuta, tako da je iz trajektorija koje su praćene duže od 40 minuta subjektivnom kvalitativnom analizom izabran segment u kojem je brzina stanice homogena tijekom navedenog perioda.

2.4.1. Analiza vremenskih serija

Vremenska serija je naziv za slijed promatranih događaja u vremenu, koji može biti kontinuiran ($\{x_t\}$) ili diskretan ($\{x_n\}$). Vremenske serije mogu se analizirati u vremenskoj domeni i u frekvencijskoj domeni. Metode analize u vremenskoj domeni (npr. određivanje autokorelacije) su jednostavnije za interpretaciju, ali osjetljivije na šum od metoda u frekvencijskoj domeni (npr. određivanje spektralne gustoće).

Normalizirana autokorelacijska funkcija vektora brzine definirana je, s obzirom na njihov skalarni produkt, kao

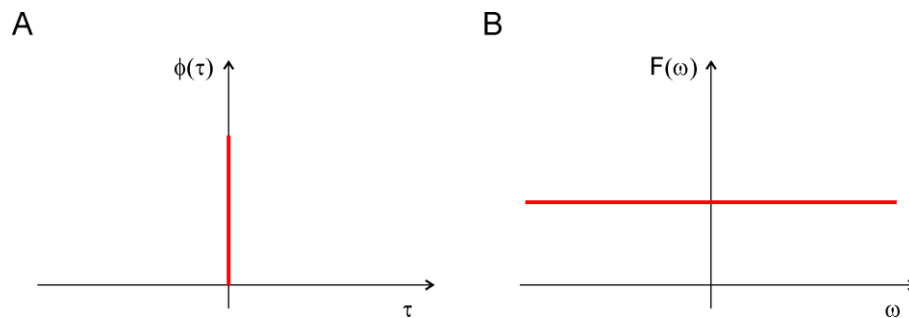
$$\phi_{\vec{v}}(\tau) = \frac{\langle (\vec{v}(t + \tau) - \vec{\mu}_{\vec{v}}) \cdot (\vec{v}(t) - \vec{\mu}_{\vec{v}})) \rangle_t}{\langle (\vec{v}(t) - \vec{\mu}_{\vec{v}}) \cdot (\vec{v}(t) - \vec{\mu}_{\vec{v}})) \rangle_t} ,$$

gdje je \vec{v} vektor brzine, a $\vec{\mu}_{\vec{v}}$ srednja vrijednost vektora brzine. Normalizirana autokorelacijska funkcija amplitude brzine definirana je s

$$\phi_v(\tau) = \frac{\langle (v(t + \tau) - \mu_v) \cdot (v(t) - \mu_v) \rangle_t}{\sigma_v^2} ,$$

gdje je v amplituda vektora brzine, μ_v srednja vrijednost brzine, a σ_v^2 varijanca brzine.

Spektralna analiza je tehnika analize u frekvencijskoj domeni čiji je često korišteni alat Fourierova transformacija. Funkcija spektralne gustoće opisuje snagu varijance kao funkciju frekvencije. Kao primjer, u slučaju bijelog šuma svaka frekvencija će imati jednaki udio u ukupnoj varijanci sistema te će njezova autokorelacijska funkcija imati oblik δ -funkcije (slika 2.2.a), a njezova spektralna gustoća će biti konstantna (slika 2.2.b).



Slika 2.2. Autokorelacijska funkcija (A) i funkcija spektralne gustoće (B) bijelog šuma.

Spektralna gustoća diskretne vremenske serije, odnosno periodogram, može se dobiti Fourierovom transformacijom autokorelograma na slijedeći način

$$S(\omega) = \frac{1}{2\pi} \sum_{\tau=-\infty}^{\infty} \phi(\tau) e^{-i\tau\omega}, \quad -\pi \leq \omega \leq \pi, \quad e^{-i\omega} = \cos \omega + i \sin \omega$$

S obzirom da je $\phi(\tau) = \phi(-\tau)$, prethodni odnos se može zapisati i kao

$$S(\omega) = \frac{1}{2\pi} \left(\phi(0) + 2 \sum_{\tau=1}^{\infty} \phi(\tau) \cos(\tau\omega) \right).$$

2.5. Grupiranje podataka

2.5.1. Metoda grupiranja podataka

Metoda grupiranja podataka ili klasterska analiza (engl. *cluster analysis*) je metoda nenadzirane klasifikacije kojom se međusobno slični objekti grupiraju u istu skupinu (engl. *cluster*) dok se međusobno različiti objekti grupiraju u različite skupine. Svaki objekt opisan je pomoću jedne ili više varijabli i na taj način smješten u višedimenzionalni prostor definiran varijablama kao osima tog prostora.

Kao alat za grupiranje podataka korišten je algoritam *k*-srednjih vrijednosti (engl. *k-means algorithm*). Algoritam *k*-srednjih vrijednosti je iterativna procedura u kojoj se pripadnost objekta nekoj skupini određuje prema udaljenosti objekta od centroida skupine. Centroid predstavlja srednju lokaciju određene skupine u prostoru i izračunava se kao prosječna vrijednost koordinata (varijabli) svih objekata koji toj skupini pripadaju. Nakon što korisnik odredi broj skupina *k*, algoritam *k*-srednjih vrijednosti radi na slijedeći način:

1. Nasumično se odredi položaj *k* točaka u prostoru omeđenom objektima koji se grupiraju. Ove točke su početni centroidi skupina.
2. Petlja:
 - a. Pridruži svaki objekt skupini čiji joj je centroid najbliži.
 - b. Nakon što su svi objekti grupirani, izračunaj novi položaj centroida kao središta skupina određenih u prethodnom koraku.
 - c. Ponavljaj ovaj postupak sve dok se položaj centroida mijenja između koraka a i b.

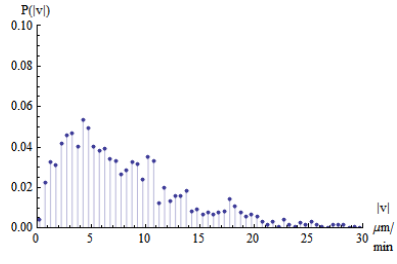
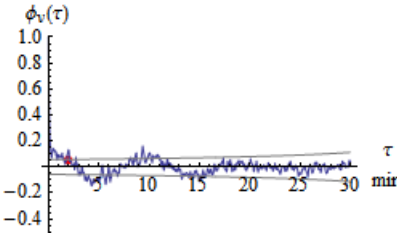
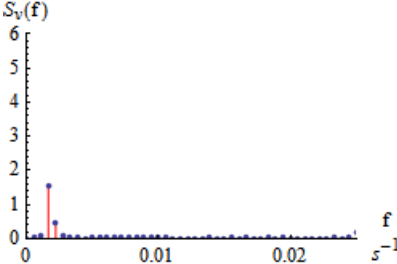
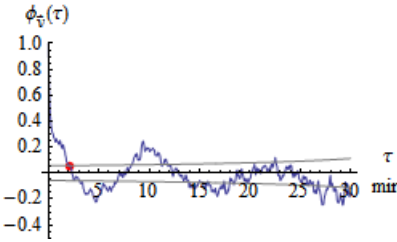
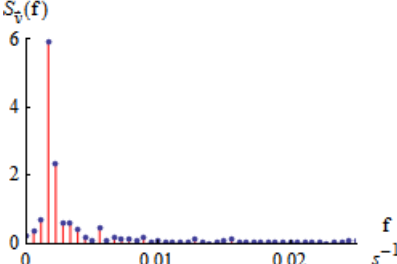
Kao mjera udaljenosti točke *i* od centroida *j* u *r*-dimenzionalnom prostoru (*r* je broj varijable) korištena je kvadratna Euklidska udaljenost, definirana s:

$$d_{ij} = \sum_{n=1}^r (r_{i,n} - r_{j,n})^2, \quad j = 1, \dots, k.$$

2.5.2. Identifikacija različitih skupina stanica

Svaka stanica promatrana je kao objekt definiran različitim varijablama koje kvantitativno opisuju gibanje stanice. Spomenute varijable izračunate su za svaku stanicu iz eksperimentalno određene distribucije brzine te autokorelograma i periodograma vektora brzine i amplitude brzine. Ukupno je definirano 14 varijabli, a njihov detaljan opis nalazi se u tablici 2.2.

Prije grupiranja podataka vrijednosti svake pojedine varijable normalizirane su na srednju vrijednost 0 i standardnu devijaciju 1. Osim toga, deset netipičnih stanica isključeno je iz analize na temelju njihove Euklidske udaljenosti od njima deset najbližih stanica. Grupiranje podataka provedeno je u programskom paketu *RapidMiner* korištenjem *k-Means* operatora.

KARAKTERISTIKA TRAJEKTORIJE	OPIS VARIJABLE	DEFINICIJA VARIJABLE	NAZIV VARIJABLE	
distribucija brzine 	srednja vrijednost	$\mu_v = \langle v_i \rangle$	avrg_speed	
	standardna devijacija	$\langle (v_i - \mu_v)^2 \rangle$	stdev_speed	
	koeficijent asimetrije	$\frac{\langle (v_i - \mu_v)^3 \rangle}{\langle (v_i - \mu_v)^2 \rangle^{3/2}}$	skew_speed	
	koeficijent zaobljenosti	$\frac{\langle (v_i - \mu_v)^4 \rangle}{\langle (v_i - \mu_v)^2 \rangle^2}$	kurt_speed	
autokorelogram brzine 	varijanca autokorelograma	$\langle (\phi_v(\tau) - \langle \bar{\phi}_v \rangle)^2 \rangle$	var_ACspeed	
	prvi vremenski pomak pri kojem autokorelogram pada ispod granice značajnosti	*	rnd_ACspeed	
periodogram brzine 	suma amplituda u niskofrekventnom području	$\sum_{f=min}^{low} S_v(f)$	$min = 0.0011 \text{ Hz}$ $low = 0.0028 \text{ Hz}$ $high = 0.0167 \text{ Hz}$ $max = 0.25 \text{ Hz}$	low_Pspeed
	suma amplituda u području srednjih frekvencija	$\sum_{f=low}^{high} S_v(f)$		mid_Pspeed
	suma amplituda u visokofrekventnom području	$\sum_{f=high}^{max} S_v(f)$		high_Pspeed
autokorelogram vektora brzine 	varijanca autokorelograma	$\langle (\phi_{\vec{v}}(\tau) - \langle \bar{\phi}_{\vec{v}} \rangle)^2 \rangle$	var_ACvel	
	prvi vremenski pomak pri kojem autokorelogram pada ispod granice značajnosti	*	rnd_ACvel	
periodogram vektora brzine 	suma amplituda u niskofrekventnom području	$\sum_{f=min}^{low} S_{\vec{v}}(f)$	$min = 0.0011 \text{ Hz}$ $low = 0.0028 \text{ Hz}$ $high = 0.0167 \text{ Hz}$ $max = 0.25 \text{ Hz}$	low_Pvel
	suma amplituda u području srednjih frekvencija	$\sum_{f=low}^{high} S_{\vec{v}}(f)$		mid_Pvel
	suma amplituda u visokofrekventnom području	$\sum_{f=high}^{max} S_{\vec{v}}(f)$		high_Pvel

Tablica 2.2. Detaljan opis varijabli korištenih u grupiranju stanica. * Vremenski pomak koji odgovara prvom značajnom padu autokorelacije ispod granice značajnosti pronađen je jednostavnim algoritmom i grafički prikazan crvenom točkom na autokorelogramu.

2.6. Procjena parametara poopćenog Langevinovog modela gibanja

Parametri Langevinovog modela proširenog memorijskim članom za svaku pojedinu skupinu stanica određeni su prilagodbom (engl. *fit*) karakteristika eksperimentalnih i simuliranih skupina trajektorija. U tu svrhu korišten je diferencijalni evolucijski algoritam (Storn i Price, 1997).

2.6.1. Simulacija trajektorija

Simulacija trajektorija razvijena je u C++ programskom jeziku. Trajektorije su opisane proširenom Langevinovom jednadžbom gibanja u slijedećem obliku:

$$\frac{d\vec{v}(t)}{dt} = -\beta(v(t)) \cdot \vec{v}(t) + \alpha^2 \int_{-\infty}^t \vec{v}(\tau) \cdot e^{-\gamma(t-\tau)} d\tau + \bar{\sigma}(\vec{v}(t)) \cdot \vec{\eta}(t),$$

s time da je

$$\beta(v) = \beta_0 + \beta_1 v,$$

a $\bar{\sigma}(\vec{v})$ tenzor koji ima komponentu paralelnu i okomitu na \vec{v} , definirane sa:

$$\sigma_{\parallel}(v) = \sigma_{\parallel 0} + \sigma_{\parallel 1} v + \sigma_{\parallel 2} v^2 \quad \text{i} \quad \sigma_{\perp}(v) = \sigma_{\perp 0} + \sigma_{\perp 1} v + \sigma_{\perp 2} v^2.$$

Stohastički član jednadžbe definiran je na slijedeći način: $\vec{\eta}(t)$ je vektor s uniformno distribuiranim smjerom i normalno distribuiranom amplitudom, a $\bar{\sigma}(\vec{v}(t))$ je transformacijska matrica koja zakreće $\vec{\eta}(t)$ za kut koji $\vec{v}(t)$ ima u odnosu na x-os (θ), mijenja amplitudu njegovih x i y komponenti te ga potom vraća u početni smjer:

$$\sigma(\vec{v}) = \begin{bmatrix} \cos \varphi & -\sin \varphi \\ \sin \varphi & \cos \varphi \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \sigma_{\parallel}(v) & 0 \\ 0 & \sigma_{\perp}(v) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi \\ -\sin \varphi & \cos \varphi \end{bmatrix}$$

Da bi se diskretnom numeričkom simulacijom kreiralo konzistentno Brownovo gibanje (Wienerov proces), potrebno je stohastički član koji je opisan diskretnim šumom pomnožiti s korijenom vremenske rezolucije, $\sqrt{1/\Delta t}$. Na ovaj način simuliran je proces čija je varijanca neovisna o vremenskoj rezoluciji, što je karakteristika Wienerovog procesa.

Simulirane su trajektorije u trajanju od 80 minuta ($t_{\text{sim}} = 4800$ s), s time da je samo druga polovica trajektorije uzeta u analizu ($t_{\text{ukupno}} = 2400$ s) kako bi se eliminirao utjecaj

početne brzine. Trajektorije su simulirane rezolucijom od 5 s^{-1} ($\Delta t = 0.2 \text{ s}$), a u analizi je korištena svaka deseta vrijednost kako bi uzorkovanje bilo jednako uzorkovanju eksperimentalno dobivenih trajektorija.

Svaka trajektorija diskretno je simulirana na slijedeći način:

$$\vec{p}_0 = \{0,0\}, \vec{v}_0 = \{0,0\}, \vec{m}_0 = \{0,0\},$$

$$\vec{a}_n = -\beta(|\vec{v}_n|) \cdot \vec{v}_n + \alpha^2 \cdot \vec{m}_n + \sigma(\vec{v}_n, \vec{\eta})$$

$$\vec{v}_{n+1} = v_n + a_n \cdot \Delta t$$

$$\vec{m}_{n+1} = \vec{m}_n \cdot e^{-\gamma \Delta t}$$

Za nešto veću preciznost simulacije na nižim rezolucijama dodan je još jedan član u zadnju jednadžbu, čime dobivamo $\vec{m}_{n+1} = \vec{m}_n \cdot e^{-\gamma \Delta t} + \vec{v}_{n+1} \cdot \Delta t \cdot \sqrt{e^{-\gamma \Delta t}}$. Rezultati ovako definirane diskretne simulacije uspoređeni su s rezultatima simulacije izvedene u programskom paketu Mathematica rješavanjem sustava diferencijalnih jednadžbi (poglavlje 10.2., „Prilozi“). Provjerom ovisnosti akceleracije o vremenu i usporedbom dobivenih rezultata uvođenjem unaprijed zadanih vrijednosti šuma, karakteristike trajektorija simulirane na oba navedena načina pokazale su se jednakima.

2.6.2. Karakterizacija podskupina stanica

U svrhu određivanja parametara Langevinovog modela, svaka podskupina stanica (biološka i simulirana) karakterizirana je raspodjelom brzine, periodogramom vektora brzine te srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom paralelne i okomite komponente akceleracije ovisne o trenutnoj brzini.

Akceleracija stanice i definirana je s

$$\vec{a}_i(t) = \frac{\vec{v}_i(t + \Delta t) - \vec{v}_i(t)}{\Delta t},$$

a njezine komponente, paralelna i okomita na smjer brzine, definirane su s

$$a_{\parallel}(t) = |\vec{a}(t)| \cdot \cos \varphi_{\vec{v}(t), \vec{a}(t)} \quad \text{i} \quad a_{\perp}(t) = |\vec{a}(t)| \cdot \sin \varphi_{\vec{v}(t), \vec{a}(t)},$$

s time da okomita komponenta ima negativan predznak ako je vektorski produkt brzine i akceleracije negativan, odnosno ako stanica skreće u desno.

Za izračun periodograma vektora brzine Fourierovom transformacijom autokorelacije vektora brzine u programskom jeziku C++ korištena je FFTW biblioteku („The fastest Fourier transform in the west“; Frigo i Johnson, 2005).

2.6.2.1. Usporedba raspodjele brzine

Za usporedbu raspodjele brzine uspoređivane su normalizirane vrijednosti prvih 20 binova u rasponu vrijednosti od 0 do 20 $\mu\text{m}/\text{min}$. Svaka od 20 vrijednosti imala je jednaku važnost pri ocjeni razlike dvaju krivulja (F_s), definirane korijenom iz srednje vrijednosti sume kvadrata razlike (engl. *root-mean-square deviation*, *RMSD*).

2.6.2.2. Usporedba akceleracije

Ocjena razlike krivulja srednje paralelne komponente akceleracije (F_{AP}) i njezine standardne devijacije (F_{SAP}) te standardne devijacije okomite komponente akceleracije (F_{SAO}) definirane su na isti način kao u prethodno opisanoj usporedbi raspodjele brzine.

2.6.2.3. Usporedba periodograma vektora brzine

U svrhu usporedbe periodograma vektora brzine, vrijednosti periodograma grupirane su po frekvencijskom pojasevima u 14 binova. Prvih osam binova sadrže po jednu vrijednost (frekvencije redom: 0.0008, 0.0012, 0.0017, 0.0020, 0.0025, 0.0029, 0.0033, 0.0037 Hz). Sljedeći binovi sadrži srednje vrijednosti periodograma po daljnjim frekvencijskim intervalima: 0.0044-0.0050 Hz, 0.0055-0.0072 Hz, 0.0078-0.0117 Hz, 0.0122-0.0205 Hz, 0.0211-0.0383 Hz, te 0.0388-0.0738 Hz. Ocjena razlike periodograma eksperimentalno dobivenih i simuliranih populacija trajektorija (F_P) definirana je korijenom iz srednje vrijednosti sume kvadrata razlike u vrijednostima periodograma na prethodno navedenim frekvencijama.

2.6.3. Diferencijalni evolucijski algoritam

Optimizacija je matematički postupak pronalaženja najboljih vrijednosti iz skupa mogućih vrijednosti. U našem slučaju pronalaženja parametara modela, optimizacijski problem se sastoji u izboru rješenja $\vec{x} = \{x_1, x_2, \dots, x_D\}$, $\vec{x} \in R^D$, takvog da minimizira ciljnu

funkciju $F(\vec{x})$. Diferencijalni evolucijski algoritam (DEA) spada u optimizacijske metode koje ne zahtijevaju izračun parcijalnih derivacija i istovremeno barataju s više različitih vektora potencijalnih rješenja. Ova metoda uspješno pronalazi globalni minimum ciljne funkcije, ali zahtjeva određen broj iteracija. Općenito, evolucijski algoritmi su heurističke metode pretraživanja i optimiranja koje simuliraju proces prirodne evolucije. Ovaj proces započinje inicijalizacijom, odnosno stvaranjem populacije jedinki sa nasumično odabranim vrijednostima, takozvane prve generacije ($G=1$). Jedinka (u našem slučaju vektor s realnim komponentama) predstavlja potencijalno rješenje problema.

U diferencijalnom evolucijskom algoritmu, kreiranje nove jedinke (potomka, $\vec{x}_{i,G+1}$) iz jedinke prethodne generacije ($\vec{x}_{i,G}$) odvija se na slijedeći način:

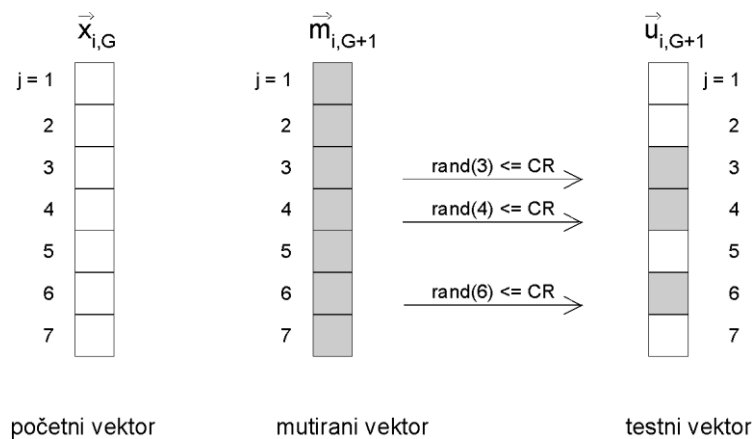
1. Iz populacije se izaberu tri nasumične jedinke te se kreira novi, mutirani vektor ($\vec{m}_{i,G+1}$) po slijedećem principu: $\vec{m}_{i,G+1} = \vec{x}_{r_1,G} + M \cdot (\vec{x}_{r_2,G} - \vec{x}_{r_3,G})$. Konstanta mutacije M je realna konstanta s vrijednošću između 0 i 2.
2. Nakon toga se radi križanje mutiranog vektora s početnim vektorom te nastaje testni vektor ($\vec{u}_{i,G+1}$) tako da se svaka njegova komponenta računa po slijedećem principu:

$$\vec{u}_{ji,G+1} = \begin{cases} \vec{m}_{ji,G+1} & \text{ako je } (randb(j) \leq CR) \text{ ili } j=rnbr(i) \\ \vec{x}_{ji,G} & \text{ako je } (randb(j) > CR) \text{ ili } j \neq rnbr(i) \end{cases}.$$

$randb(j)$ je uniformno distribuirana nasumična varijabla s rasponom vrijednosti od 0 do 1, a CR je konstanta križanja s vrijednosti između 0 i 1. $rnbr(i)$ je nasumično izabrani indeks komponente koji osigurava da testni vektor $\vec{u}_{i,G+1}$ dobije barem jednu komponentu iz mutiranog vektora $\vec{m}_{i,G+1}$. Nastanak $\vec{u}_{i,G+1}$ ovim putem prikazan je shematski na slici 2.3.

3. Novo kreirani testni vektor, $\vec{u}_{i,G+1}$, i početni vektor, $\vec{x}_{i,G}$, ulaze u proces selekcije, a samo vektor koji ima nižu ciljnu funkciju opstaje i postaje jedinka nove generacije, $\vec{x}_{i,G+1}$.

Navedeni proces mutacije, križanja i selekcija provodi se za svaku jedinku populacije, a kao rezultat nastaje nova populacija s jednakim brojem jedinki (NP) kao i početna generacija.



Slika 2.3. Shema procesa križanja unutar diferencijalnog evolucijskog algoritma; $D = 7$ (prilagođeno prema *Storn i Price, 1997*).

2.6.4. Procjena parametara modela

U našem optimizacijskom problemu, rješenje, odnosno jedinka populacije s kojom radi DEA, je skup parametara modela gibanja, oblika:

$$\vec{x}_{i,G} = \{\beta_0, \beta_1, \alpha, \gamma, \sigma_{\parallel 0}, \sigma_{\parallel 1}, \sigma_{\parallel 2}, \sigma_{\perp 0}, \sigma_{\perp 1}, \sigma_{\perp 2}\}.$$

Sa svakim skupom parametara simulirano je 40 trajektorija, koji su zatim karakterizirane i uspoređene s karakteristikama eksperimentalno dobivenih trajektorija. Rezultat ove usporedbe je vrijednost ciljne funkcije $F(\vec{x}_{i,G})$, koja je definirana kao

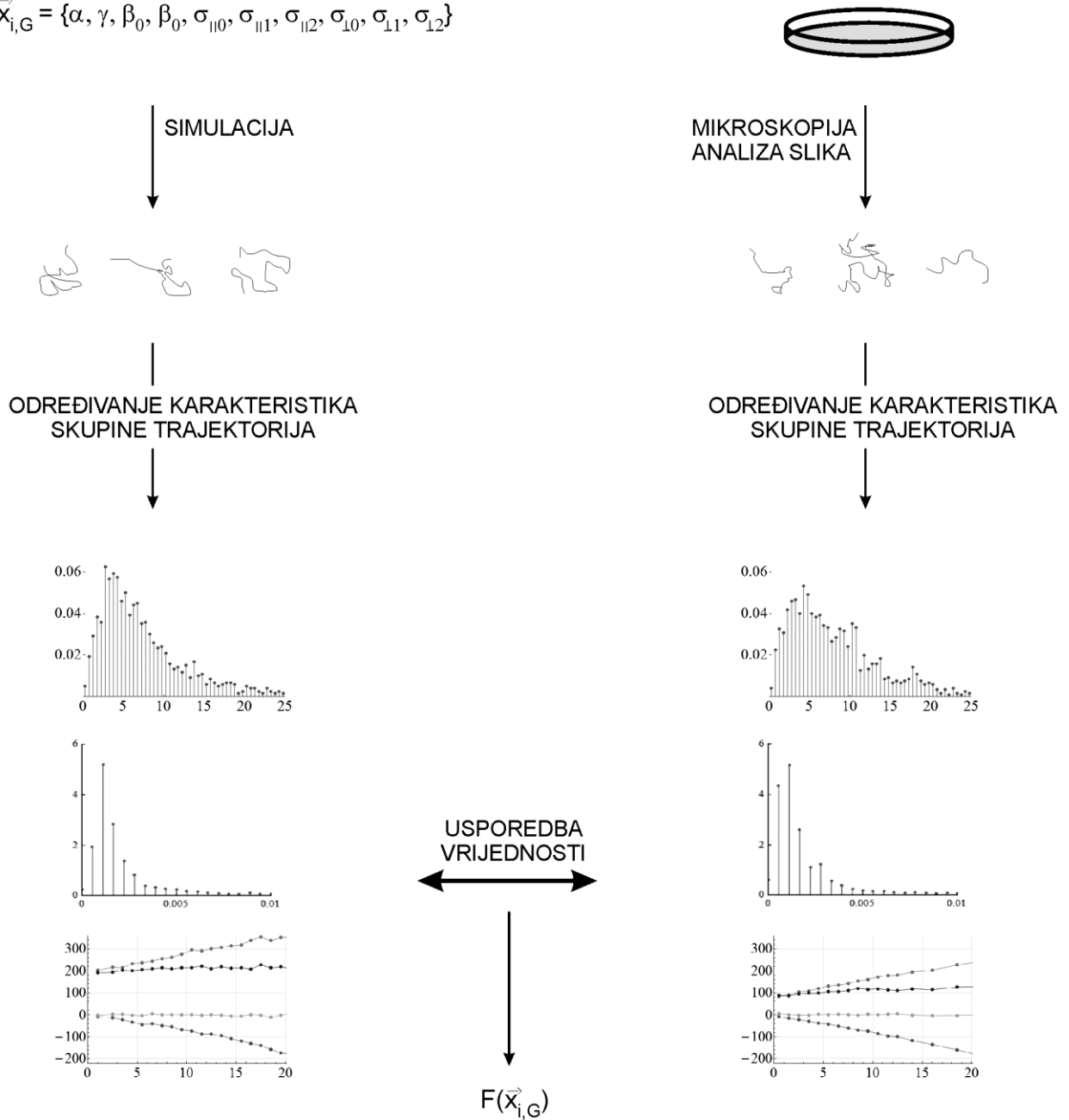
$$F(\vec{x}_{i,G}) = \frac{F_S(\vec{x}_{i,G})}{3} + \frac{F_{AP}(\vec{x}_{i,G})}{9} + \frac{F_{SAP}(\vec{x}_{i,G})}{9} + \frac{F_{SAO}(\vec{x}_{i,G})}{9} + \frac{F_P(\vec{x}_{i,G})}{3}.$$

Shema ocjene pojedinog skupa parametara, $\vec{x}_{i,G}$, prikazana je na slici 2.4.

Optimizacija parametara provedena je sa slijedećim postavkama DEA: broj jedinki (NP) iznosi 40, konstanta mutacije (M) iznosi 0.5, a konstanta križanja (CR) 0.9. Kao ograničavajući faktor za DEA, maksimalan broj generacija G_{max} postavljen je na 300. Ovako opisani postupak izvođenja DEA ponavlja se 15 puta, svaki put s iznova stvorenom populacijom jedinki nasumično odabranih vrijednosti. Ograničenja parametara postavljena su samo za prvu generaciju (nasumično generiranih) jedinki, i to u slijedećim rasponima: za

parametar α od -0.1 do 0.1 , parametar γ od 0 do 1 , β_0 od 0 do 0.03 , β_1 od 0 do 2×10^5 , σ_0 od 0 do 1×10^{-7} , σ_1 od -1 do 0.02 te za σ_2 od -1×10^{-7} do 1×10^5 .

$$\vec{x}_{i,G} = \{\alpha, \gamma, \beta_0, \beta_1, \sigma_{10}, \sigma_{11}, \sigma_{12}, \sigma_{20}, \sigma_{21}, \sigma_{22}\}$$

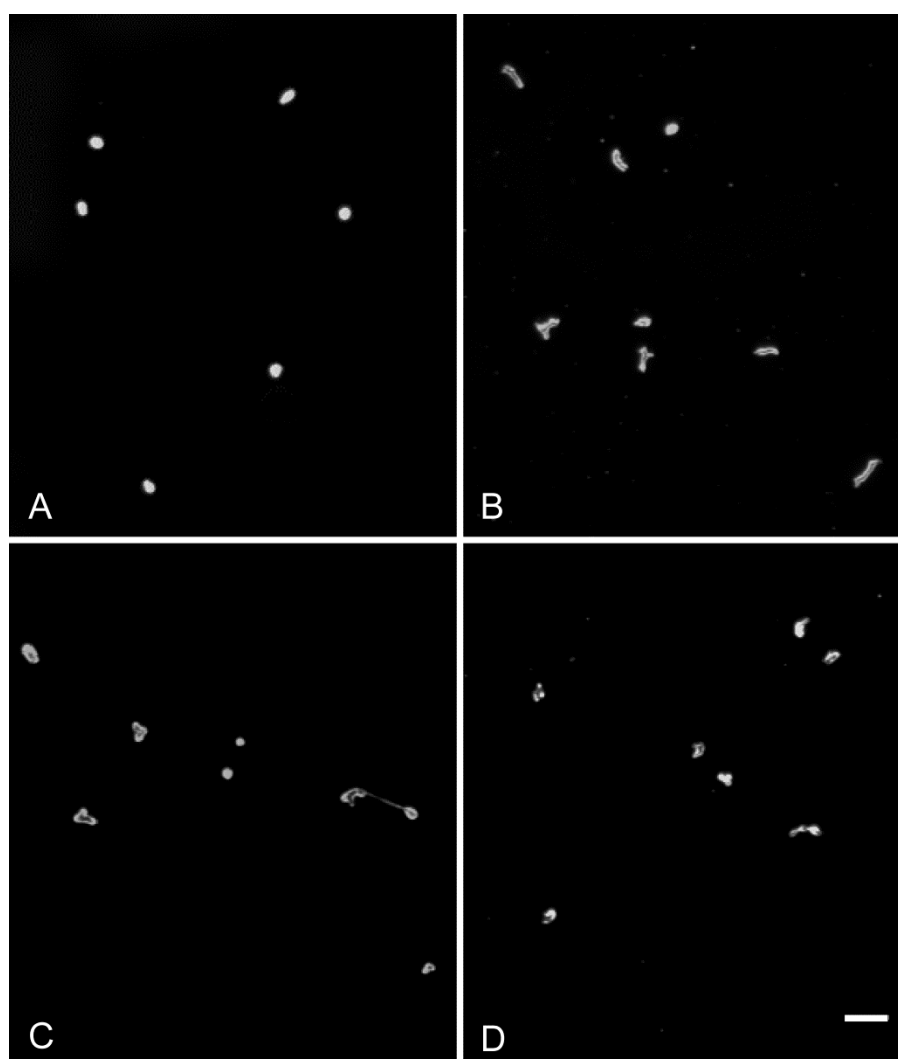


Slika 2.4. Shema određivanja vrijednosti ciljne funkcije $F(\vec{x}_{i,G})$ pojedinog skupa parametra $\vec{x}_{i,G}$.

3. Rezultati

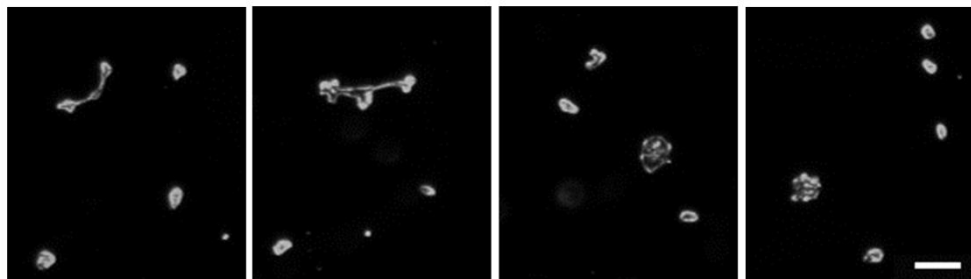
3.1. Gibanje stanica promatranih populacija *D. discoideum*

Eksperimenti praćenja kretanja stanica (engl. *cell tracking*) provedeni su na četiri različite populacije stanica ameboidnog protista *Dictyostelium discoideum* – stanicama divljeg tipa (soj AX2), promatranim u vegetativnoj fazi i u agregacijski kompetentnoj fazi, te stanicama deficitarnim za korteksiline (soj CI/CII), promatranim također u vegetativnoj i agregacijski kompetentnoj fazi. Tipičan izgled navedenih populacija promatranih pod svjetlosnim mikroskopom primjenom tehnike tamnog polja prikazan je na slici 3.1.



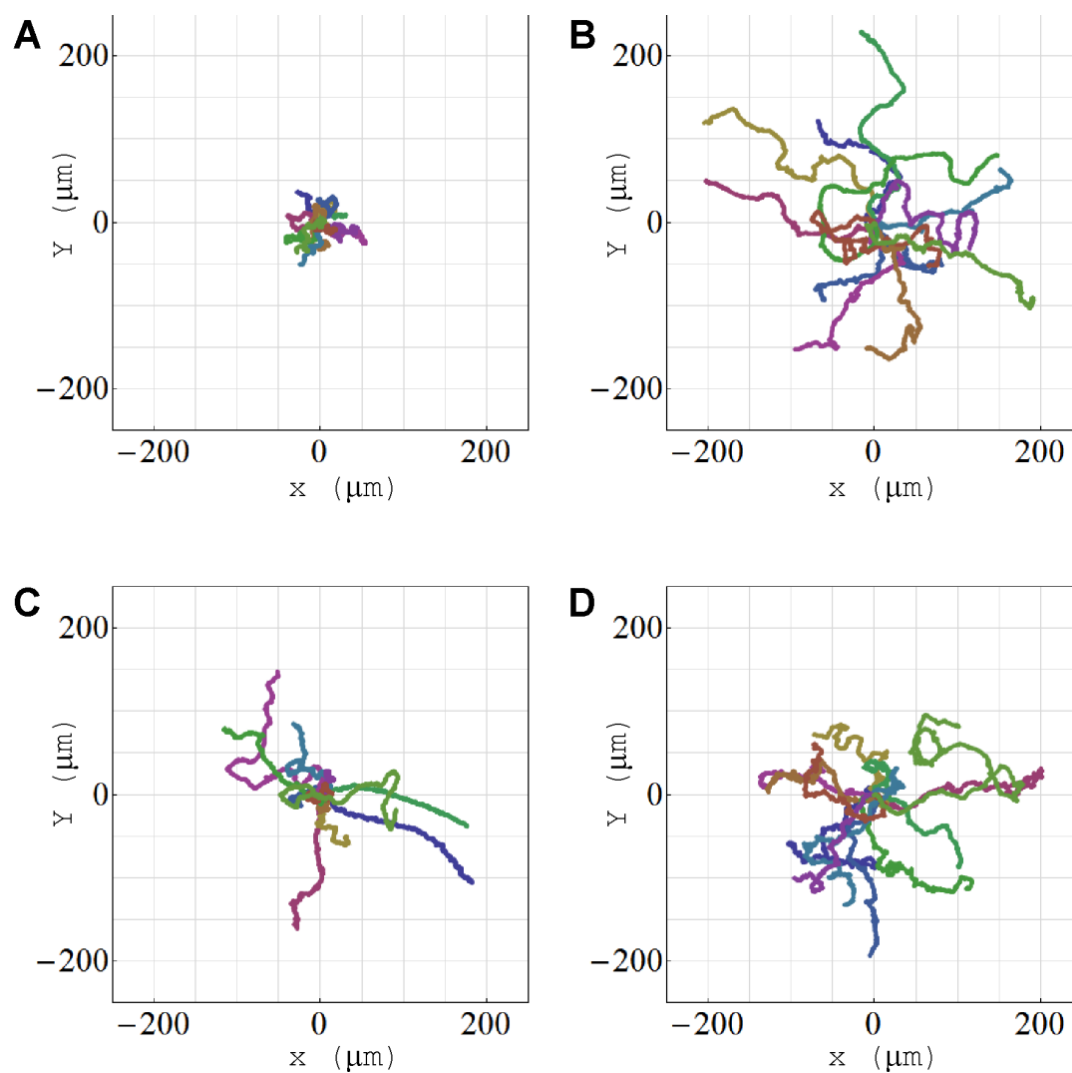
Slika 3.1. Populacije stanica protista *D. discoideum* promatrane mikroskopijom tamnog polja: (A) vegetativne AX2 stanice, (B) agregacijski kompetentne AX2 stanice, (C) vegetativne CI/CII stanice i (D) agregacijski kompetentne CI/CII stanice. Mjerilo iznosi 50 μm .

Stanice soja CI/CII često prolaze kroz nepravilnu ili neuspješnu diobu, što se jasno vidi na filmovima stanica praćenih u vegetativnoj fazi (slika 3.2.). Velike, multinukleirane stanice ili stanice povezane citoplazmatskim mostovima nisu korištene u daljnjoj analizi.



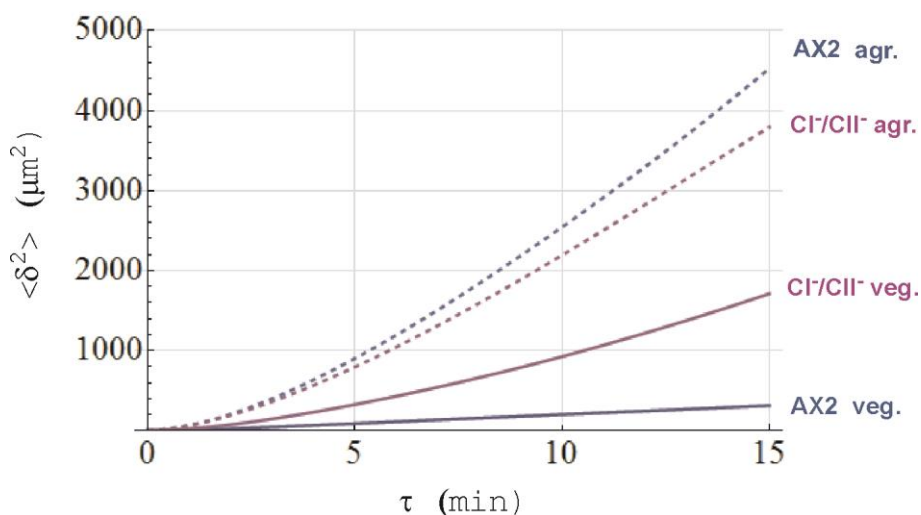
Slika 3.2. Primjeri vegetativnih stanica CI/CII soja *D. discoideum* koje prolaze kroz neuspješnu diobu. Mjerilo iznosi 50 μm .

Automatskom analizom serija digitalnih slika dobivene su trajektorije stanica, odnosno vremenske serije položaja geometrijskog centra, tzv. centroide, pojedinačnih stanica. Na slici 3.3. prikazane su trajektorije po 12 tipičnih stanica četiriju promatranih populacija. U stanicama divljeg tipa, AX2, agregacijski kompetentne stanice prelaze veće udaljenosti (imaju veću usmjerenost i veću brzinu) od vegetativnih stanica istog soja (slika 3.3. a i b). Vegetativne stanice deficijentne za korteksiline, CI/CII, često prelaze veće udaljenosti od vegetativnih stanica divljeg tipa (slika 3.3. a i c). S druge strane, agregacijski kompetentne stanice soja deficijentnog za korteksiline prelaze manje udaljenosti od agregacijski kompetentnih stanica divljeg tipa, iako sudeći po izgledu trajektorija, razlog tome nije manja brzina, već manja usmjerenost stanica (slika 3.3. b i d).



Slika 3.3. Karakteristične trajektorije stanica četiri različitih populacija *D. discoideum* praćenih tijekom 40 min: (A) vegetativnih AX2, (B) agregacijski kompetentnih AX2, (C) vegetativnih CI/CI1 i (D) agregacijski kompetentnih CI/CI2 stanica. Za svaku populaciju prikazano je 12 trajektorija.

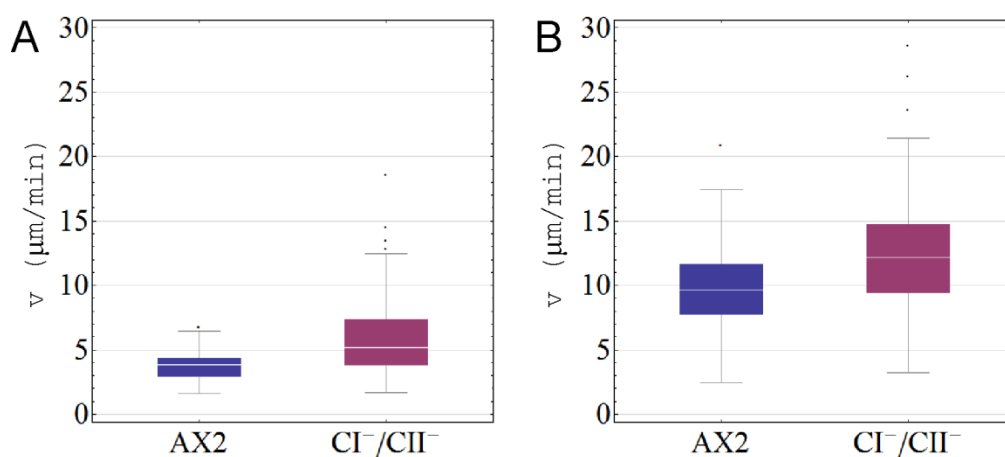
Ukupno je analizirana 601 stanica, od toga: 141 stanica soja AX2 u vegetativnoj fazi i 141 stanica soja AX2 u fazi razvoja, te 220 stanica soja CI/CII u vegetativnoj fazi i 99 stanica soja CI/CII u fazi razvoja. Za svaku populaciju stanica izračunata je srednja kvadratna udaljenost, odnosno kvadrat udaljenosti koju tipična stanica pojedine populacije prijeđe u određenom vremenskom intervalu. Vrijednosti srednje kvadratne udaljenosti u ovisnosti o vremenu prikazane su na slici 3.4.



Slika 3.4. Srednje kvadratne udaljenosti za četiri promatrane populacije stanica („veg.“: vegetativne; „agr.“: agregacijski kompetentne).

Iako, očekivano, agregacijski kompetentne CI/CII stanice prelaze veće udaljenosti od vegetativnih CI/CII stanica, vegetativne CI/CII stanice prelaze veće udaljenosti od vegetativnih AX2 stanica, dok agregacijski kompetentne CI/CII stanice prelaze manje udaljenosti od agregacijski kompetentnih AX2 stanica, što ukazuje na različit utjecaj korteksilina na gibanje stanica u različitim fazama životnog ciklusa.

Za svaku stanicu izračunata je srednja trenutna brzina te na temelju toga i medijan brzine pojedine populacije stanica. U vegetativnoj fazi životnog ciklusa medijan brzine AX2 stanica iznosi **3.85** $\mu\text{m}/\text{min}$ (IQR 2.91–4.39), a CI⁻/CII⁻ stanica **5.16** $\mu\text{m}/\text{min}$ (IQR 3.85–7.40). U agregacijski kompetentnoj fazi medijan brzine AX2 stanica iznosi **9.66** $\mu\text{m}/\text{min}$ (IQR 7.73–11.70), a CI⁻/CII⁻ stanica **12.17** $\mu\text{m}/\text{min}$ (IQR 9.41–14.73). Raspodjele vrijednosti brzine za svaku populaciju stanica prikazane su na slici 3.5.

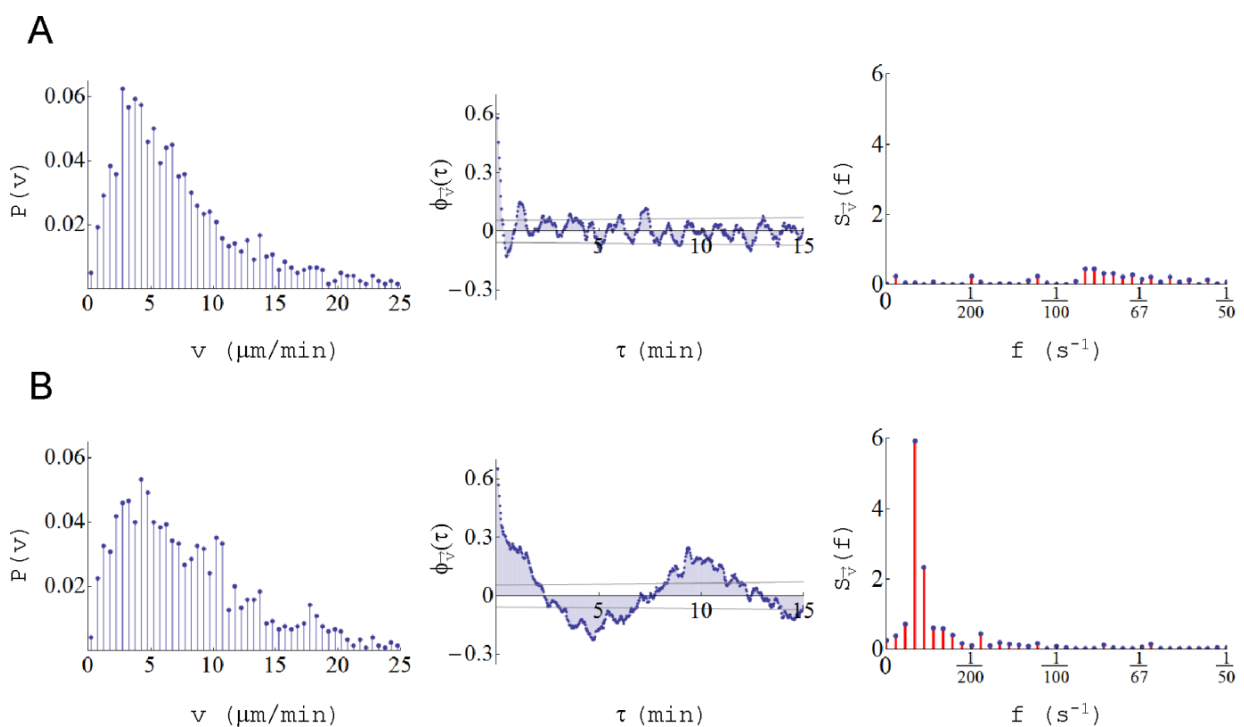


Slika 3.5. Raspodjele trenutnih brzina stanica u promatranim populacijama *D. discoideum* u (A) vegetativnoj i (B) agregacijski kompetentnoj fazi životnog ciklusa.

Vegetativne CI⁻/CII⁻ stanice imaju značajno veću trenutnu brzinu od vegetativnih AX2 stanica, a agregacijski kompetentne CI⁻/CII⁻ stanice imaju značajno veću trenutnu brzinu od agregacijski kompetentnih AX2 stanica, što je za oba slučaja potvrđeno neparametrijskim Mann-Whitney U testom ($P < 0.0001$).

3.2. Raspodjela stanica u skupine na temelju individualnih karakteristika gibanja

U svim eksperimentima uočena je velika heterogenost stanica s obzirom na način njihovog kretanja po podlozi, što nas je potaknulo da pronađemo varijable koji bi metodom nenadziranog učenja (engl. *unsupervised learning*) razdvojili stanice pojedine populacije u dvije ili više skupina, od kojih bi svaka obuhvatila stanice sličnog načina gibanja. Kao primjer heterogenosti pojedine populacije, na slici 3.6. prikazane su dvije agregacijski kompetentne AX2 stanice koje imaju slične distribucije amplitude brzine, ali pokazuju velike razlike u autokorelogramu vektora brzine i, posljedično, periodogramu vektora brzine. Stanica prikazana na slici 3.6.a pokazuje značajan signal na frekvencijama 0.012-0.017 (period između 60 i 90 sekundi), dok stanica na slici 3.6.b pokazuje jaki signal na frekvencijama 0.001-0.003 (period između 5 i 15 minuta).



Slika 3.6. Distribucija amplitude brzine te autokorelogram i periodogram vektora brzine za dvije stanice koje pripadaju istoj populaciji – agregacijski kompetentnim AX2 stanicama: (A) stanica rednog broja 68 i (B) stanica rednog broja 71.

3.2.1. Karakteristike gibanja pojedinih stanica

Putanja svake promatrane stanice opisana je raspodjelom amplitude brzine, autokorelogramom i periodogramom amplitude brzine te autokorelogramom i periodogramom vektora brzine. Iz navedenih karakteristika izvedeno je ukupno 14 varijabli koji opisuju gibanje stanice. Varijable izvedene iz raspodjele brzine su: srednja vrijednost, standardna devijacija, koeficijent asimetrije i koeficijent zaobljenosti distribucije brzine. Varijable izvedene iz autokorelograma (brzine i vektora brzine) su: varijanca autokorelograma i vremenski pomak pri kojem vrijednost autokorelograma pada ispod granice značajnosti. Periodogrami vektora brzine i amplitude brzine opisani su sumom amplitude signala unutar slijedećih vremenskih intervala: između 4 i 58 sekundi (suma amplituda u visokofrekventnom području), između 1 i 6 minuta (suma amplituda u području srednjih frekvencija) te između 6 i 15 minuta (suma amplituda u niskofrekventnom području). Navedene varijable korištene su kao atributi stanica prilikom njihove klasifikacije, a detaljno su opisane u poglavlju „Materijali i metode“ (tablica 2.2.).

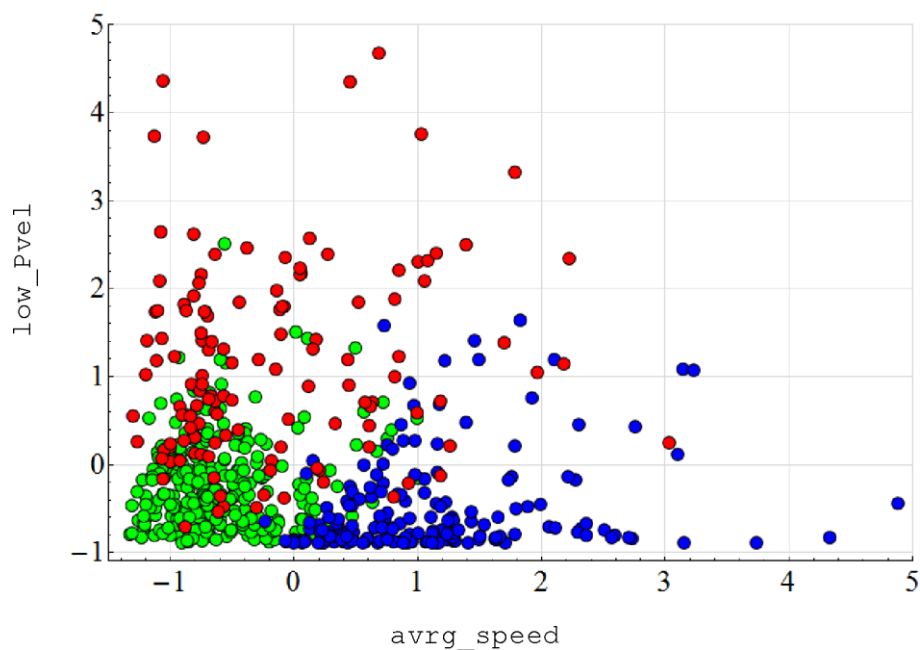
Prethodno grupiranju, vrijednosti svake pojedine varijable standardizirane su s obzirom na njezinu srednju vrijednost i standardnu devijaciju unutar populacije svih promatranih stanica (ukupno njih 601). Rasponi vrijednosti spomenutih varijabli prije i poslije standardizacije navedeni su u tablici 3.1.

VARIJABLA	RASPON VRIJEDNOSTI	RASPON VRIJEDNOSTI
		NAKON STANDARDIZACIJE
avrg_speed	1.6357 – 28.5288	-1.3246 – 4.8762
stdev_speed	0.9965 – 16.7494	-1.3203 – 3.7591
skew_speed	0.6636 – 10.4360	-1.0664 – 10.2862
kurt_speed	3.1404 – 179.3517	-0.4448 – 14.2310
var_ACspeed	0.0018 – 0.0162	-1.0428 – 7.8695
rnd_ACspeed	0.4833 – 8.3500	-0.5706 – 9.8083
var_ACvel	0.0025 – 0.0757	-1.0278 – 7.0910
rnd_ACvel	0.4833 – 12.4833	-1.1070 – 5.6682
low_Pspeed	0.0000 – 1.0354	-2.1995 – 4.2133
mid_Pspeed	0.0000 – 5.1171	-1.3407 – 7.3243
high_Pspeed	0.0000 – 9.5255	-0.6086 – 10.0548
low_Pvel	0.0019 – 1.9852	-2.3141 – 4.3686
mid_Pvel	0.0020 – 8.3274	-1.4541 – 4.4236
high_Pvel	0.0000 – 35.6043	-0.8939 – 7.7540

Tablica 3.1. Rasponi vrijednosti varijabli u populaciji svih promatranih stanica, prije i poslije standardizacije.

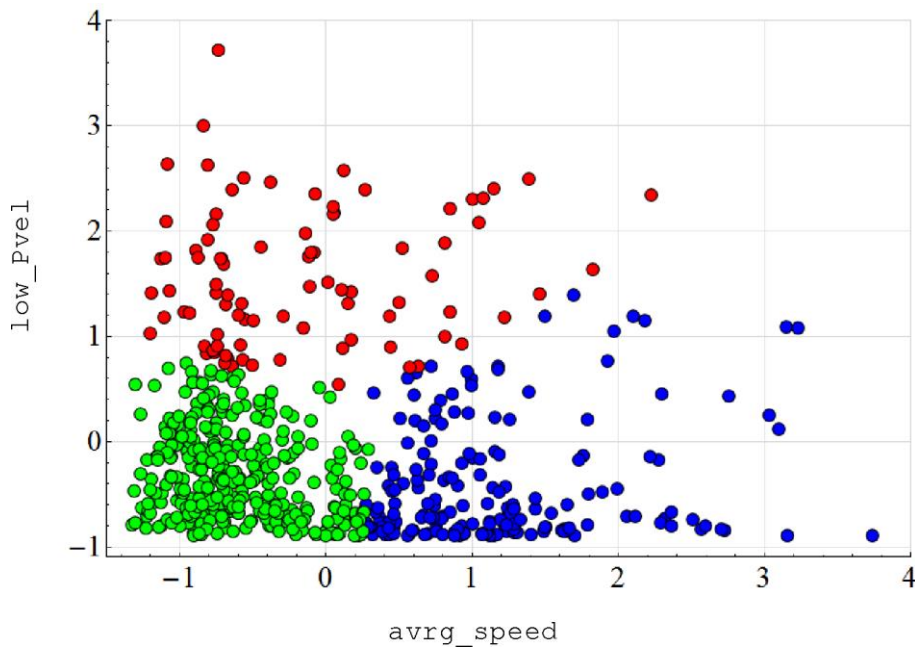
3.2.2. Identifikacija skupina stanica

S obzirom da se radi o nenadziranoj klasifikaciji, dakle klasifikaciji bez prethodnih informacija o pripadnosti pojedinoj populaciji, sve praćene stanice promatrane su kao jedna populacija te ih izabrani algoritam nenadzirano razvrstava u zadani broj skupina na temelju njihovih međusobne sličnosti ili različitosti. Koristeći algoritam k -srednjih vrijednosti na populaciji stanica opisanih sa prethodno definiranih 14 varijabli identificirane su tri različite skupine stanica. Na slici 3.7. prikazana je raspodjela navedenih skupina (prikazanih zelenom, plavom i crvenom bojom) u prostoru dviju varijabli koje su se pokazale najznačajnijima za razdvajanje skupina – srednja brzina stanica (avrg_speed) i suma amplituda periodograma u niskofrekventnom području (low_Pvel).



Slika 3.7. Raspodjela tri skupine (označene zeleno, plavo i crveno), koje su identificirane grupiranjem stanica opisanih sa 14 varijabli, u prostoru dviju najznačajnijih varijabli: normalizirane srednje brzine stanica (`avrg_speed`) i normalizirane sume amplituda periodograma u niskofrekventnom području (`low_Pvel`).

Grupiranje podataka provedeno je ponovno, ali ovog puta koristeći samo dvije prethodno navedene varijable. Ovako inducirane tri skupine stanica prikazane su na slici 3.8. zelenom, plavom i crvenom bojom te opisane na slijedeći način: stanice koje pripadaju skupini označenoj zelenom bojom imaju manje brzine kretanja, stanice koje pripadaju skupini označenoj plavom bojom imaju velike brzine kretanja, a stanice koje pripadaju skupini označenoj crvenom bojom imaju velike vrijednosti periodograma na niskim frekvencijama, što ih razlikuje od prethodne dvije skupine.

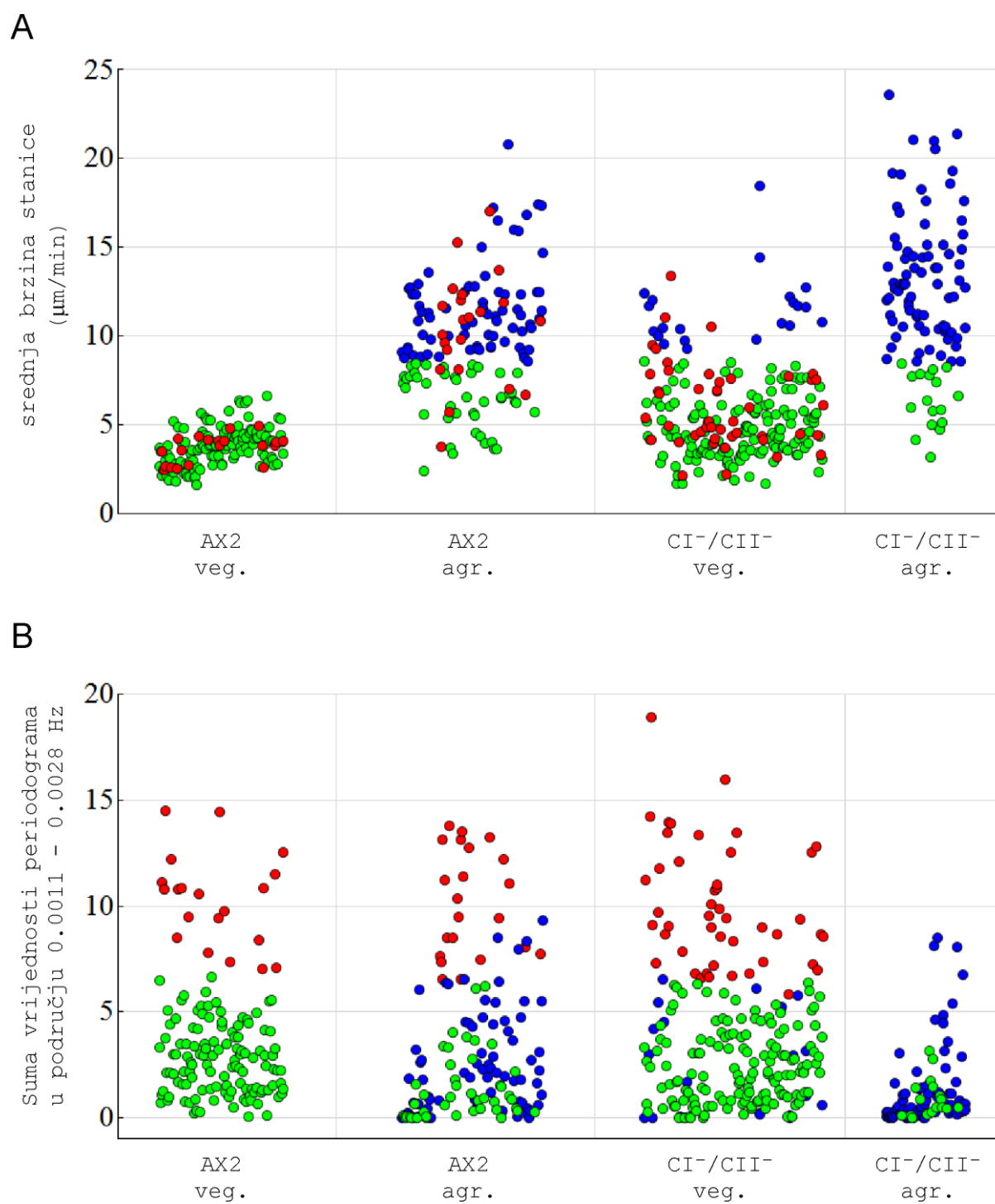


Slika 3.8. Raspodjela tri skupine (označene zeleno, plavo i crveno), identificirane grupiranjem stanica opisanih s dvije varijable: normaliziranom srednjom brzinom stanica (avrg_speed) i normaliziranom sumom amplituda periodograma u niskofrekventnom području (low_Pvel).

3.2.3. Raspodjela identificiranih skupina unutar različitih populacija

Populacija vegetativnih stanica AX2 soja raspodijelila se u samo dvije identificirane skupine, a niti jedna stanica ne pripada skupini stanica okarakteriziranih velikom brzinom kretanja. Populacija agregacijski kompetentnih stanica AX2 soja ima članove unutar sve tri identificirane skupine. Populacija vegetativnih stanica CI/CII raspodijelila se u sve tri identificirane skupine, a populacija agregacijski kompetentnih CI/CII stanica samo u dvije, jer niti jedna stanica ne pripada skupini stanica okarakteriziranih velikim vrijednostima periodograma na niskim frekvencijama.

Nestandardizirane vrijednosti srednje brzine i sume amplituda periodograma na niskim frekvencijama za sve praćene stanice prikazane su na slici 3.9. Pripadnost pojedine stanice određenoj skupini prikazana je istim sustavom boja kao i na slici 3.8. – zelena predstavlja skupinu karakteristično malih brzina, plava skupinu karakteristično velikih brzina, a crvena skupinu karakteristično velikih vrijednosti periodograma u niskofrekventnom području.



Slika 3.9. Prisutnost skupina (zelena, plava i crvena) u različitim populacijama stanica *D. discoideum* u ovisnosti o (A) srednjoj brzini stanice i (B) sumi amplituda periodograma u niskofrekventnom području. Skupine su prikazane istim sustavom boja kao i na slici 3.8.

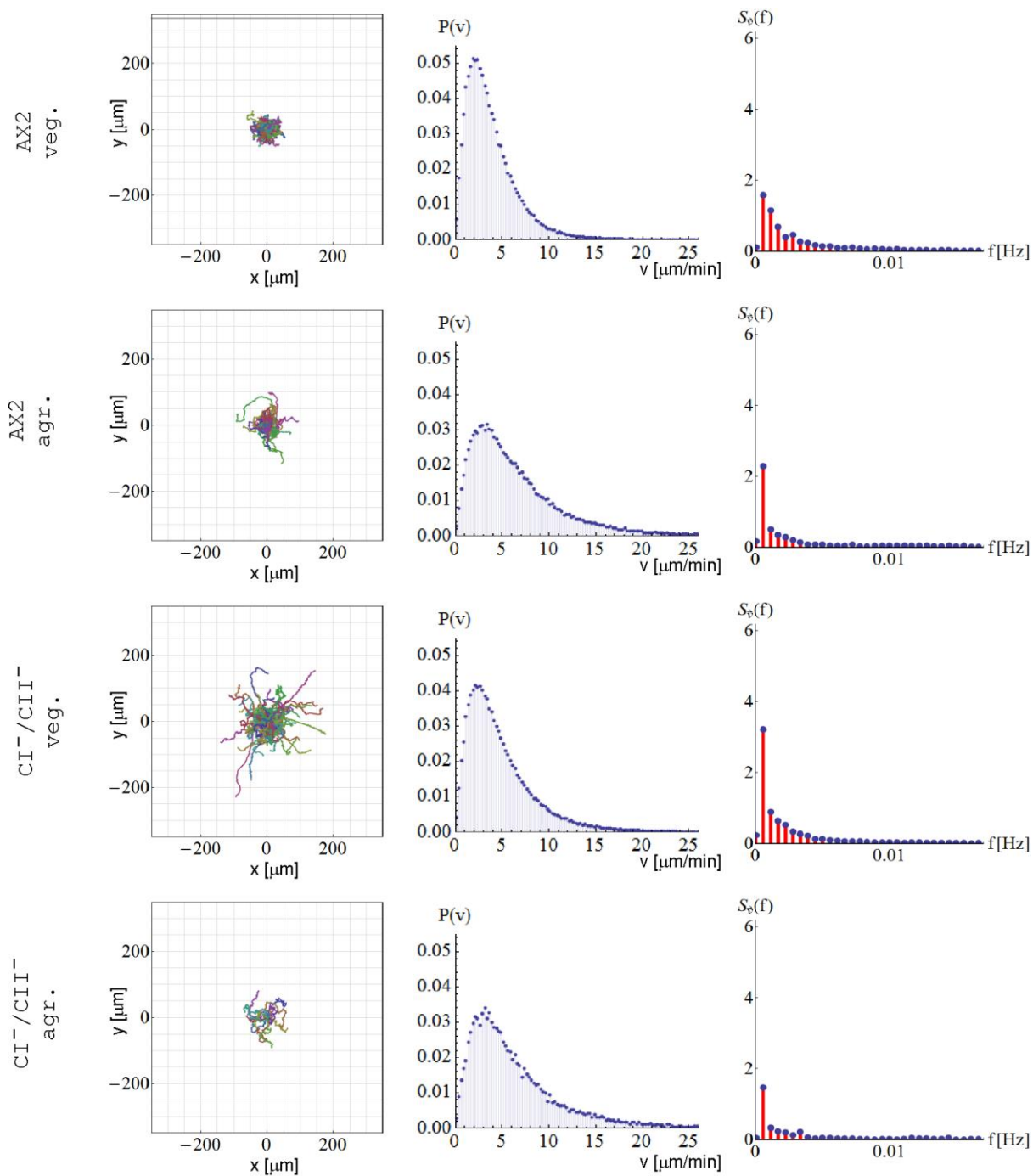
3.3. Karakteristike gibanja identificiranih podskupina stanica

Kao podskupinu stanica definirali smo stanice unutar pojedine populacije (npr. vegetativne stanice AX2 soja) koje pripadaju istoj skupini (npr. stanice malih brzina kretanja). U tablici 3.2. prikazana je raspodjela stanica svake populacije po podskupinama.

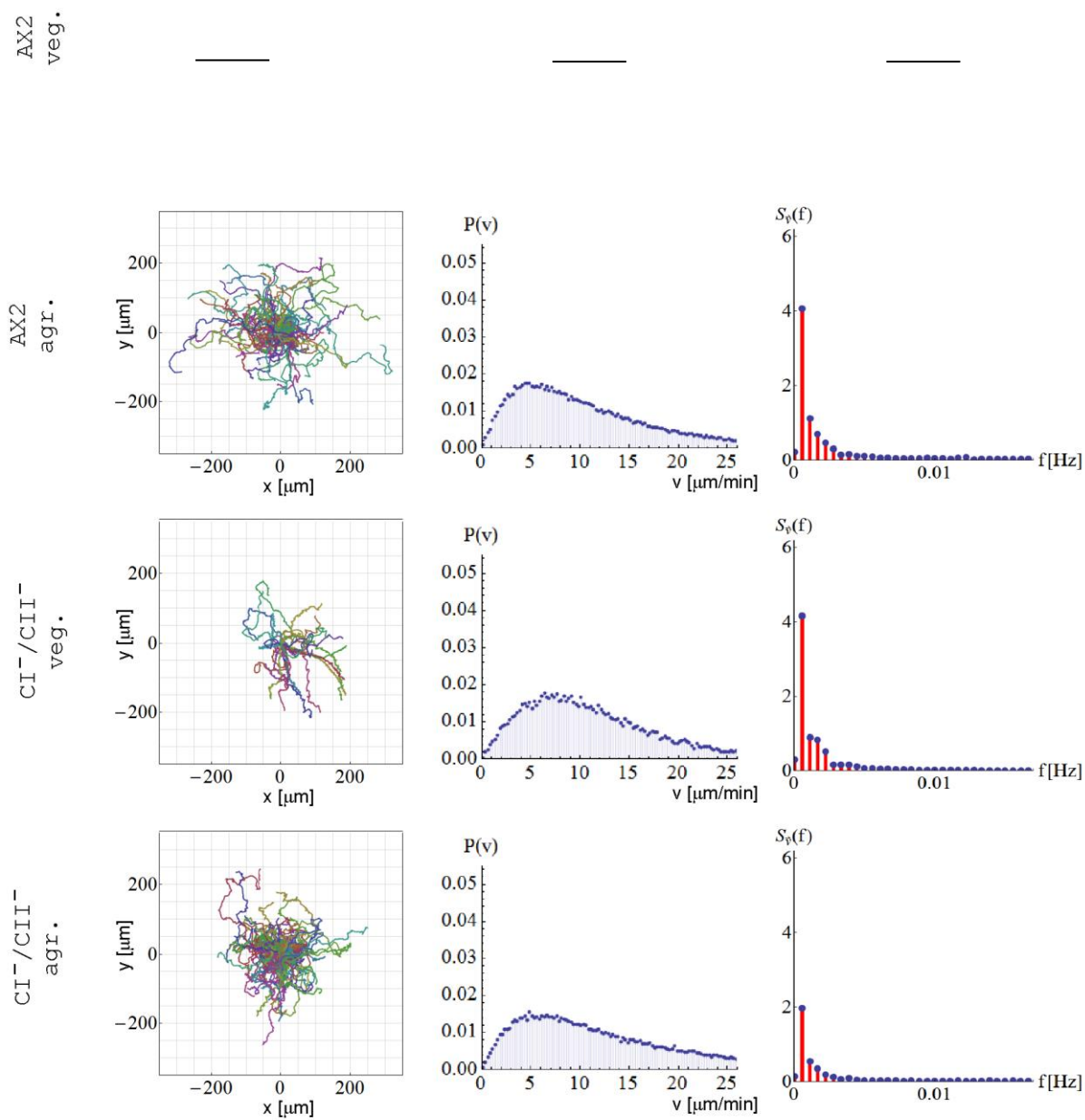
		male brzine kretanja	velike brzine kretanja	veliki udio signala na niskim frekvencijama	Σ
AX2	veg.	86 %	-	14 %	100 %
	agr.	32 %	52 %	16 %	100 %
CI/CII	veg.	69 %	10 %	21 %	100 %
	agr.	18 %	82 %	-	100 %

Tablica 3.2. Raspodjela stanica pojedinih populacija u identificirane podskupine.

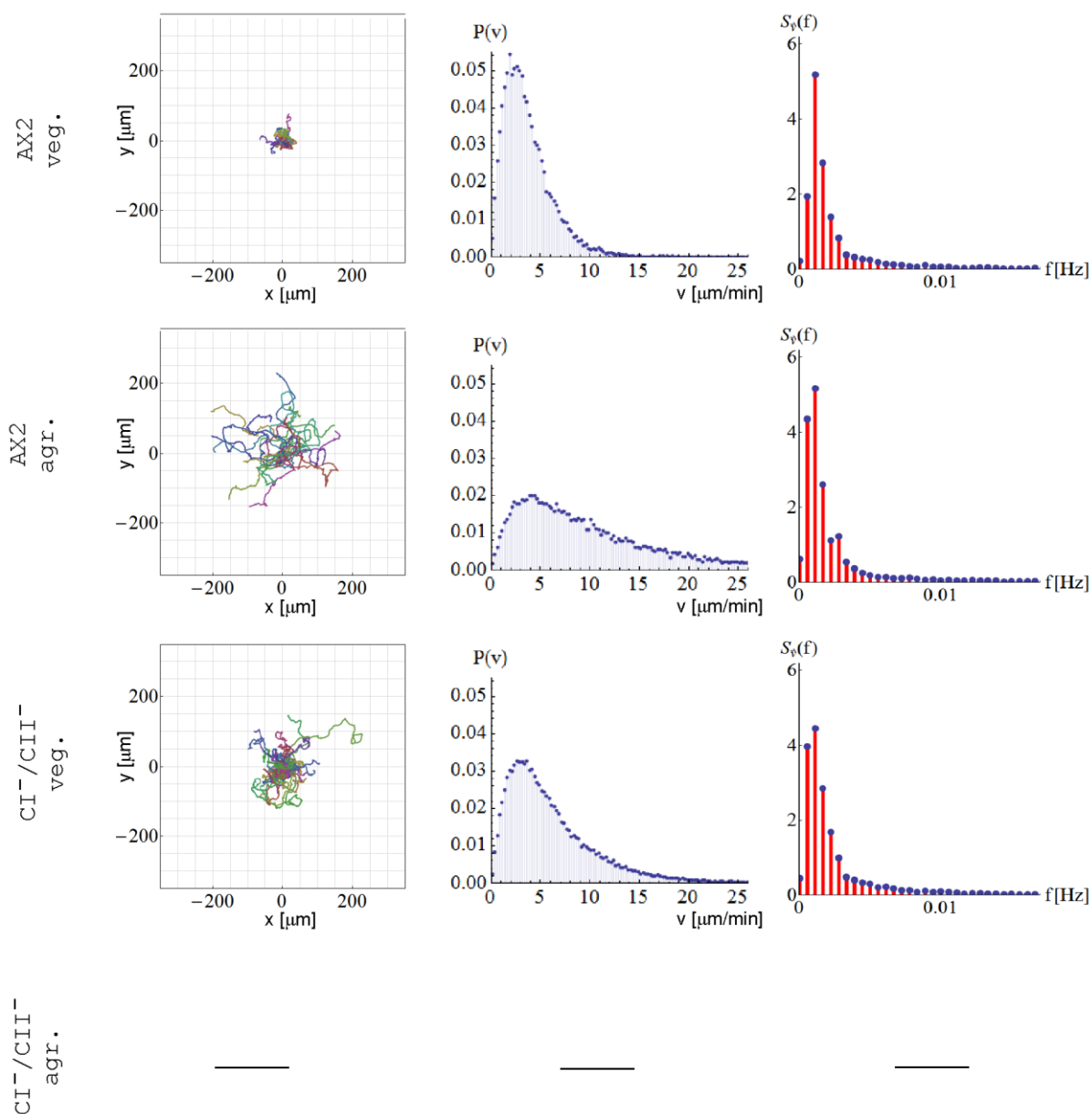
U svrhu određivanja parametara Langevinovog modela, za svaku ovako definiranu podskupinu stanica određene su: raspodjela brzine, periodogram vektora brzine te ovisnost paralelne i okomite komponente akceleracije o brzini. Trajektorije stanica, raspodjele brzina i periodogrami prikazani su na slikama 3.10., 3.11. i 3.12. Ovisnosti akceleracije o brzini prikazane su na slici 10.1. u poglavlju „Prilozi“.



Slika 3.10. Trajektorije stanica, raspodjele trenutne brzine i periodogrami vektora brzine za sve podskupine unutar skupine stanica **malih brzina kretanja**. Broj stanica u navedenim podskupinama je slijedeći: 119 u AX2 veg.; 44 u AX2 agr., 149 u CI⁻/CII⁻ veg; 17 u CI⁻/CII⁻ .



Slika 3.11. Trajektorije stanica, raspodjele trenutne brzine i periodogrami vektora brzine za sve podskupine unutar skupine stanica **velikih brzina kretanja**. Broj stanica u navedenim podskupinama je slijedeći: 73 u AX2 agr., 21 u CI-/CII- veg; 80 u CI-/CII- agr.



Slika 3.12. Trajektorije stanica, raspodjele trenutne brzine i periodogrami vektora brzine za sve podskupine unutar skupine stanica s **jakim signalom na niskim frekvencijama**. Broj stanica u navedenim podskupinama je sljedeći: 20 u AX2 veg.; 22 u AX2 agr., 46 u CI⁻/CII⁻ veg.

3.4. Parametri poopćenog Langevinovog modela gibanja podskupina stanica

Kako bismo odredili parametre Langevinovog modela gibanja za identificirane podskupine stanica, bilo je potrebno simultano usporediti karakteristike populacije trajektorija simuliranih određenim setom parametara s karakteristikama odgovarajuće eksperimentalno dobivene populacije. Metoda procjene parametara za svaku identificirane podskupinu detaljno je opisana u poglavlju 2.6. („Materijali i metode“).

U tablicama 3.3., 3.4. i 3.5. prikazani su parametri koji kreiraju trajektorije karakteristika najbližijih karakteristikama eksperimentalnih trajektorija. Trajektorije su opisane jednadžbom

$$\frac{d\vec{v}(t)}{dt} = -\beta(v(t)) \cdot \vec{v}(t) + \alpha^2 \int_{-\infty}^t \vec{v}(\tau) \cdot e^{-\gamma(t-\tau)} d\tau + \bar{\sigma}(\vec{v}(t)) \cdot \vec{\eta}(t),$$

s time da je $\beta(v) = \beta_0 + \beta_1 v$, a $\bar{\sigma}(\vec{v})$ tenzor koji ima komponentu paralelnu i okomitu na \vec{v} , definirane sa: $\sigma_{\parallel}(v) = \sigma_{\parallel 0} + \sigma_{\parallel 1} v + \sigma_{\parallel 2} v^2$ i $\sigma_{\perp}(v) = \sigma_{\perp 0} + \sigma_{\perp 1} v + \sigma_{\perp 2} v^2$.

identificirana skupina	soj	faza životnog ciklusa	α	γ
male brzine	AX2	veg.	0.079	0.037
		agr.	0.076	0.030
	CI/CII	veg.	0.061	0.027
		agr.	0.083	0.025
velike brzine	AX2	agr.	0.068	0.025
	CI/CII	veg.	0.097	0.032
		agr.	0.080	0.026
signal na niskim frekvencijama	AX2	veg.	0.183	0.074
		agr.	0.095	0.042
	CI/CII	veg.	0.118	0.056

Tablica 3.3. Vrijednosti parametara $\alpha [s^{-1}]$ i $\gamma [s^{-1}]$, koji opisuju memoriju stanice u poopćenom Langevinovom modelu gibanja.

identificirana skupina	soj	faza životnog ciklusa	β_0	$\beta_1 (\times 10^6)$
male brzine	AX2	veg.	0.177	0.734
		agr.	0.192	0.412
	CI/CII	veg.	0.079	0.743
		agr.	0.102	1.053
velike brzine	AX2	agr.	0.172	0.159
		veg.	0.084	0.875
	CI/CII	agr.	0.062	0.589
		veg.	0.434	0.762
signal na niskim frekvencijama	AX2	agr.	0.202	0.136
		veg.	0.202	0.477
	CI/CII	veg.	0.202	0.477

Tablica 3.4. Vrijednosti parametara funkcije $\beta(v) [s^{-1}]$, koja opisuju kočenje stanice u poopćenom Langevinovom modelu gibanja.

identificirana skupina	soj	faza životnog ciklusa	$\sigma_{\parallel 0} (\times 10^{-7})$	$\sigma_{\parallel 1}$	$\sigma_{\parallel 2} (\times 10^6)$	$\sigma_{\perp 0} (\times 10^{-7})$	$\sigma_{\perp 1}$	$\sigma_{\perp 2} (\times 10^6)$
male brzine	AX2	veg.	0.291	0.380	-2.405	0.594	-1.362	7.191
		agr.	0.356	0.381	0.168	0.372	0.316	-0.686
	CI/CII	veg.	0.169	0.310	0.505	0.210	0.222	-0.097
		agr.	0.285	0.565	0.235	0.421	0.296	-0.658
velike brzine	AX2	agr.	0.694	0.311	0.012	0.716	0.119	-0.361
		veg.	1.206	0.151	0.237	-1.944	1.061	-0.375
	CI/CII	agr.	1.205	0.412	-0.006	1.437	-0.397	-0.202
		veg.	0.246	0.680	-3.808	0.643	-0.932	1.248
signal na niskim frekvencijama	AX2	agr.	0.461	0.370	-0.112	0.535	0.058	-0.045
		veg.	0.183	0.419	-0.094	0.268	0.250	-0.354
	CI/CII	veg.	0.183	0.419	-0.094	0.268	0.250	-0.354

Tablica 3.5. Vrijednosti parametara funkcije $\sigma(v) [m/s^{2/3}]$, koja opisuju šum u poopćenom Langevinovom modelu gibanja.

Karakteristike populacija trajektorija simuliranih parametrima navedenim u tablicama 3.3 do 3.5. i vrijednosti ciljnih funkcija prikazane su na slikama 10.3. do 10.12. u poglavlju „Prilozi”, usporedno s karakteristikama odgovarajućih eksperimentalno izmjerenih populacija trajektorija.

4. Rasprava

4.1. Gibanje stanica protista *D. discoideum* deficijentnih za korteksiline I i II

Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal Langevinovog modela gibanja proširenog memorijskim članom u karakterizaciji stanica s izmijenjenim molekularnim sastavom aktinskog citoskeleta, a time i mogućnost primjene ovog jednostavnog matematičkog modela u boljem razumijevanju utjecaja pojedinih proteina na kontrolu dinamike aktinskog citoskeleta. U tu svrhu odabrali smo soj protista *D. discoideum* deficijentan za proteine korteksilin I i korteksilin II (CI/CII). Korteksilini usnopljuju aktinske filamente i unakrsno ih povezuju u trodimenzionalne strukture (Faix i sur., 1996), te na taj način sudjeluju u formiranju staničnog korteksa koji ima važnu funkciju u kontroli oblika stanice, pokretljivosti stanice i sposobnosti pričvršćivanja stanice za podlogu (Sackmann, 1994).

Gibanje stanica soja CI/CII u homogenoj okolini bez prisustva vanjskih signala uspoređeno je s gibanjem stanica divljeg tipa, AX2, i to u dvjema različitim fazama životnog ciklusa – vegetativnoj i agregacijski kompetentnoj fazi. Pokazali smo da u korištenim uvjetima stanice CI/CII imaju značajno veću trenutnu brzinu gibanja od stanica AX2, i to u obje faze životnog ciklusa (slika 3.5). Po našem saznanju, ovo je prvi rad u kojem je analizirano nestimulirano kretanje stanica soja CI/CII. Dobivene vrijednosti brzine ovih stanica stoga se ne mogu direktno usporediti s dosada objavljenim radovima o korteksilinskim mutantima, u kojima se istraživalo isključivo usmjereno gibanje stanica tijekom kemotaksije. Shu i suradnici (2012) istraživali su gibanje agregacijski kompetentnih stanica CI/CII prema točkastom izvoru cAMP-a, te su ustanovili da se CI/CII stanice kreću 30% sporije od stanica divljeg tipa. Međutim, stanice deficijentne za korteksiline imaju smanjenu sintezu cAR1 receptora i ACA ciklaze te smanjenu aktivaciju ACA ciklaze, što znači da su neučinkovitije u detekciji, pojačavanju i prijenosu cAMP signala od stanica divljeg tipa (Shu i sur., 2012). U našim uvjetima, gdje su stanice promatrane u homogenoj i izotropnoj okolini, ovaj mehanizam ne bi trebao igrati ulogu u regulaciji staničnog gibanja.

Lee i suradnici (2010) također su promatrali gibanje agregacijski kompetentnih stanica CI/CII prema točkastom izvoru cAMP, te navode da nema značajne razlike u brzini divljeg tipa i dvostrukog korteksilinskog mutanta. Ovaj rezultat treba, međutim, razmatrati izdvojeno, jer su autori, prema dostupnim informacijama, uspoređivali CI/CII soj izveden iz

AX2 soja s divljim tipom AX3. Oba navedena aksenična soja, AX2 i AX3, izvedena su iz prvog izoliranog laboratorijskog soja *D. discoideum*, NC4, i koriste se kao ishodišni i kontrolni sojevi, tzv. laboratorijski divlji tipovi, u mnogobrojnim komparativnim istraživanjima (Bloomfield i sur., 2008). Međutim, njihovi genotipovi nisu identični te je preporučljivo dodatno mutirane sojeve uspoređivati s njihovim roditeljskim sojem (Pollitt i sur., 2006; Schilde i sur., 2004). Dodatan problem uspoređivanja eksperimentalno određenih brzina u spomenutim radovima predstavlja sama definicija brzine. U našim eksperimentalnim postavkama, gibanje stanica praćeno je uz vremensku rezoluciju od 0.5 s^{-1} , te je stoga srednja brzina stanice definirana kao prosječni pomak stanice u periodu od 2 sekunde. U nekim drugim radovima, kao npr. u prethodno navedenom radu Lee i suradnika (2010), srednja brzina stanice definirana je kao završna udaljenost stanice od početne točke podijeljena s ukupnim vremenom praćenja, a to je mjera koja bolje opisuje usmjerenost stanice nego samu dinamiku gibanja. Praćenjem stanica s vremenskom rezolucijom 0.5 s^{-1} dobivaju se vrijednosti trenutne brzine stanica koja nije rezultat samo translokacije tijela stanice već i dinamike nastanka pseudopodija.

Povećane vrijednosti trenutne brzine gibanja stanica CI/CII u odnosu na stanice divljeg tipa odgovaraju povećanom udjelu F-aktina u CI/CII stanicama te povećanoj učestalosti nastanka bočnih pseudopodija (Cha i Jeon, 2011; Shu i sur., 2012). Pokazano je, međutim, da korteksilini osim uloge u čvrstoći i viskoelastičnosti staničnog korteksa i tvorbi kontraktilnih aktinskih struktura (Köhler i Bausch, 2012; Simson i sur., 1998; Weber i sur., 2000), sudjeluju i u prijenosu signala, bilo putem prijenosa mehaničkih signala kroz stanicu (engl. *mechanosensing*; Lee i sur., 2010; Ren i sur., 2009; Shu i sur., 2012), bilo putem indirektnog utjecaja na kinetiku biokemijskih interakcija (Filić i sur., 2014, 2012). U nastavku ćemo detaljnije opisati ta dva potencijalna mehanizma utjecaja korteksilina na kretanje stanica.

Korteksilini i miozin II imaju ključnu ulogu u određivanju mehaničkih svojstava stanice. Dvostruki korteksilinski mutanti imaju fenotip sličan mutantima miozina II – smanjenu viskoelastičnost staničnog korteksa za 20 – 30% (Girard i sur., 2004; Reichl i sur., 2008), povećanu učestalost nastanka bočnih pseudopodija (Lee i sur., 2010; Wessels i sur., 1988), te često neuspješnu staničnu diobu (Faix i sur., 1996; Zang i sur., 1997). Pokazano je da korteksilini i miozin II zajedno sudjeluju u tvorbi diobene brazde i očuvanju oblika staničnog korteksa tijekom diobe stanice (Ren i sur., 2009; Weber i sur., 1999). Kada je u stanicama deletiran protein RacE koji pozitivno regulira nakupljanje drugih proteina koji umrežuju F-

aktin u staničnom korteksu (poput dinakortina, enlazina i fimbrina), dolazi do nakupljanja miozina II i korteksilina I u deformiranom dijelu staničnog korteksa i u interfaznim stanicama (Ren i sur., 2009). Navedeno kooperativno djelovanje korteksilina i miozina II je u skladu s potrebom za stabilno umreženim F-aktinom unutar stanice (korteksilin I ostaje vezan za F-aktin 550 ms, odnosno 20 puta dulje od miozina II), kako bi klizanje miozinskih motora po aktinskim filamentima rezultiralo kontrakcijom cijele mreže aktinskih filamenata (Reichl i sur., 2008; Ren i sur., 2009). Wang i Suo (2005) pokazali su da čvrsto umrežene i napete aktinsko-miozinske strukture mogu prenositi signal kroz čitavi prostor stanice u vrlo kratkom vremenu. Lee i suradnici (2010) predložili su da kompleks, koji se sastoji od proteina GAPA, dimera korteksilina i GTPaze Rac1, sudjeluje u prijenosu mehaničkog signala kroz stanicu, odnosno da ima ulogu u kooperativnom djelovanju korteksilina i miozina II. Prema navedenim autorima, nakupljanje navedenog kompleksa i miozina II na bočnim dijelovima stanične membrane održava napetost korteksa i time sprječava nastanak pseudopodija na tim područjima. Lee i suradnici (2010) također predlažu da za razliku od navedenog, GAPA/korteksilini/Rac1, kompleksa, tetramerni kompleks koji se sastoji od proteina DGAP1, dimera korteksilina i proteina Rac1 ima ulogu u prijenosu biokemijskog signala kroz stanicu.

Sukladno tomu, Filić i suradnici (2012) predložili su da korteksilini sudjeluju u prijenosu signala time što mala Rho GTP-azu Rac1 biva sekvestrirana u tetramernom kompleksu s proteinom DGAP1 i dimerom korteksilina. Dugotrajnim vezanjem proteina Rac1 unutar navedenog kompleksa spriječena je njegova interakcija sa Scar/WAVE kompleksom koji preko Arp2/3 kompleksa aktivira polimerizaciju F-aktina i time potiče nastanak pseudopodija (Filić i sur., 2014, 2012). Tome u prilog ide činjenica da DGAP1-minus stanice, poput CI/CII stanica, također imaju veći udio F-aktina, više protruzija na membrani te veće brzine gibanja od stanica divljeg tipa (Faix i sur., 1998). Ukupno uzevši, izgleda da bez odgovarajuće kontrole količine slobodnog signalnog proteina Rac1 putem spomenutog mehanizma sekvestracije, u stanicama deficitarnim za DGAP1 ili korteksiline dolazi do nekontrolirane polimerizacije aktina, te posljedično i do protruzije pseudopodija na postraničnim dijelovima stanične membrane. Time stanica doduše postaje dinamičnija i pokretljivija, međutim, uz nefunkcionalni sustav kontrole polarizacije, stanica ne može održati usmjerenost gibanja što dolazi do izražaja u agregacijski kompetentnoj fazi, a posebno tijekom kemotaksije.

Populacija agregacijski kompetentnih CI/CII stanica u istom vremenu prelazi manje udaljenosti od stanica divljeg tipa, što se vidi iz vrijednosti srednjeg kvadratnog pomaka u vremenu (slika 3.4). S obzirom da razvojem stanica u agregacijski kompetentne stanice u divljem tipu dolazi do jače polarizacije stanica i veće ustrajnosti tijekom gibanja, povećana učestalost nastanka bočnih pseudopodija u korteksilinskom mutantu rezultira manjom pokrivenom površinom pri gibanju ove populacije stanica.

4.2. Identifikacija podskupina u populacijama AX2 i CI-/CII- stanica

Heterogenost populacije genetički identičnih jedinki uzrokovana je kombinacijom vanjskih čimbenika i unutarstaničnih varijacija. Unutarstanične varijacije mogu biti rezultat, na primjer, razlike u trenutnoj fazi staničnog ciklusa ili mogu biti uzrokovane stohastičkim varijacijama u aktivnosti pojedinih gena (Goury-Sistla i sur., 2012; Losick i Desplan, 2008). U mnogim biološkim i biomedicinskim istraživanjima nastoji se riješiti problem gubitka informacije do kojeg dolazi usrednjavanjem vrijednosti pojedinih svojstava kroz čitavu populaciju. U radu Lova i suradnika (2008) HeLa stanice razvrstane su u skupine prema fazi staničnog ciklusa, te su navedene skupine potom karakterizirane na temelju obrasca prisutnosti podskupina definiranih površinom jezgre, kondenzacijom kromosoma te razinom aktivne sinteze DNA. Navedeni obrasci potom su uspoređivani s obrascima dobivenim djelovanjem niza potencijalnih kemoterapeutika na stanice u svrhu selekcije djelotvornih kemoterapeutika. Slack i suradnici (2008) razvrstali su HeLa stanice na temelju promjena koje se u njima događaju nakon tretiranja agensima poznatih mehanizama djelovanja, u svrhu kasnijeg boljeg razlučivanja mehanizama djelovanja drugih potencijalnih terapeutika. U radu Veronike i suradnika (2009) stanice mišjih makrofaga razvrstane su u nekoliko podskupina povezivanjem njihovih morfoloških karakteristika, poput površine i promjera stanice, s načinima gibanja stanice, poput srednje brzine i prijeđenog puta, te je predložena upotreba ovakve karakterizacije protruzivnih stanica u biomedicinskim istraživanjima.

Velika heterogenost populacije agregacijski kompetentnih stanica *D. discoideum* mogla bi biti uzrokovana varijabilnom indukcijom signalnih putova potaknutih nestankom izvora hrane u individualnim stanicama. Maeda i suradnici (1989) pokazali su da odgovor stanice na izgladnjivanje ovisi o fazi staničnog ciklusa u kojem se nalazila u trenutku početka gladovanja. Generacijsko vrijeme AX2 soja *D. discoideum* uzgajanog u tresućoj kulturi iznosi oko 8 sati. Autori su temperaturnom sinkronizacijom stanica uspjeli identificirati

poziciju kontrolne točke staničnog ciklusa (engl. *checkpoint*) u srednje kasnoj G2 fazi. Bez obzira na informacije koje stanica prima iz okoline o nastupanju gladovanja, stanica započinje proces razvoja tek kada uđe u navedenu fazu staničnog ciklusa (Maeda, 2011; Maeda i sur., 1989). Goury-Sistla i suradnici (2012) pokazali su da stanice protista *D. discoideum* ubrzo nakon prelaska u okolinu bez nutrijenata spontano i reverzibilno mijenjaju distribuciju srednjih brzina stanica unutar populacije. Autori su manualno podijelili populaciju stanica na dvije skupine – stanice s većom i stanice s manjom brzinom – te potvrdili povezanost između brzine pojedine stanice, koncentracije unutarstaničnog Ca^{2+} iona, te konačne diferencijacije iste stanice, odnosno uloge koju poprima u kasnije formiranom plodnom tijelu. Stanice koje se kreću brže imaju više koncentracije unutarstaničnog Ca^{2+} i tendenciju da formiraju stalak plodnog tijela, dok stanice koje se kreću sporije imaju manje unutarstaničnog Ca^{2+} i tendenciju diferencijacije u spore (Goury-Sistla i sur., 2012). Azhar i suradnici (2001) navode da u stanicama *D. discoideum* koncentracija staničnog Ca^{2+} ovisi o fazi staničnog ciklusa, odnosno da stanice koje se nalaze u S ili ranoj G2 fazi posjeduju visoke koncentracije Ca^{2+} , dok stanice u srednjoj ili kasnoj G2 fazi staničnog ciklusa imaju niske koncentracije Ca^{2+} iona. Autori također pokazuju da stanice s visokom koncentracijom Ca^{2+} vjerojatnije postaju dio stalka plodnog tijela, dok stanice s nižom koncentracijom Ca^{2+} preferencijalno diferenciraju u spore. Povećane koncentracije Ca^{2+} u stanici povezane su i s povećanom aktivnosti PI3-kinaze i nakupljanjem F-aktina (Evans i Falke, 2007).

Kako bismo imali što manje subjektivnog utjecaja na grupiranje stanica odlučili smo se na metodu grupiranja podataka koja po principu nenadziranog učenja svrstava pojedine objekte u skupine tako da svaki objekt završi u skupini sa sebi sličnim objektima koji su različiti od objekata u drugim skupinama. Iako smo svaku stanicu opisali sa 14 varijabli izvedenih iz raspodjele amplitude brzine te autokorelacije i periodograma vektora i amplitude brzine (tablice 2.2. i 3.1.), nakon početnog grupiranja stanica uočili smo da na raspodjelu stanica po skupinama dominantno utječu dvije varijable: srednja brzina stanica i suma amplituda periodograma u niskofrekventnom području (slika 3.7.). Stoga smo ponovili postupak grupiranja uzevši u obzir samo ove dvije varijable što je rezultiralo u formiranju homogenijih grupa, te smo ovu podjelu koristili u daljnjoj analizi podataka (slika 3.8.). Ovaj primjer pokazuje kako se kompleksni podaci ispravnim odabirom kvantitativnih deskriptora mogu klasificirati u mali broj dobro definiranih skupina.

Prethodna istraživanja pokazala su da se u gibanju stanica *D. discoideum* očituju tri različite vremenske skale – prva vremenska skala od 10 do 30 sekundi (visoke frekvencije), druga od 1 do 3 minute (srednje frekvencije) te treća između 6 i 12 minuta (niske frekvencije) (Bosgraaf i Van Haastert, 2009; Li i sur., 2011; Shenderov i Sheetz, 1997; Takagi i sur., 2008). Na osnovu ovih smo se pretpostavki odlučili za karakterizaciju svojstava periodograma brzine stanice pomoću suma amplituda na niskim, srednjim i visokim frekvencijama. Veliki udio signala na niskim frekvencijama (0.0011 – 0.0028 Hz) može se protumačiti kao oscilatorna memorija stanice na dugim vremenskim intervalima između 6 i 15 minuta.

Kao rezultat nenadzirane klasifikacije, sve su se analizirane stanice podijelile u tri skupine: skupinu stanica s malom prosječnom brzinom, skupinu stanica s velikom prosječnom brzinom te skupinu stanica koja se od prve dvije razlikuje velikim udjelom signala na niskim frekvencijama (slika 3.8.). Zanimljivim se pokazalo kako su se pojedine biološke populacije stanica raspodijelile po identificiranim skupinama (slika 3.9.). Za razliku od vegetativnih AX2 stanica, dio vegetativnih CI/CII stanica svrstan je u skupinu karakteristično velikih prosječnih brzina stanice što ukazuje na udio stanica, u ovoj populaciji, koje se kreću netipično brzo za stanice u vegetativnoj fazi životnog ciklusa. Ove stanice utječu na povećanu prosječnu brzinu populacije, što je i vidljivo iz tablice 4.1.

soj		male brzine kretanja	velike brzine kretanja	veliki udio signala na niskim frekvencijama
AX2	veg.	3.81 ± 1.09	-	3.68 ± 0.78
	agr.	6.45 ± 1.65	11.60 ± 2.53	10.43 ± 3.08
CI/CII	veg.	4.83 ± 1.66	11.49 ± 2.04	6.11 ± 2.37
	agr.	6.40 ± 1.59	13.44 ± 3.47	-

Tablica 4.1. Srednje vrijednosti brzina stanica u pojedinim podskupinama.

U populaciji agregacijski kompetentnih CI/CII stanica, niti jedna stanica nije svrstana u skupinu stanica s velikim udjelom niskih frekvencija, što sugerira nemogućnost izmijenjenog molekularnog aparata tih stanica da „pamti“ smjer gibanja u periodima duljim od nekoliko minuta. U svim ostalim promatranim populacijama, 15–21% stanica smješteno je u navedenu skupinu (tablica 3.2.).

4.3. Karakterizacija stanica parametrima poopćenog Langevinovog modela gibanja

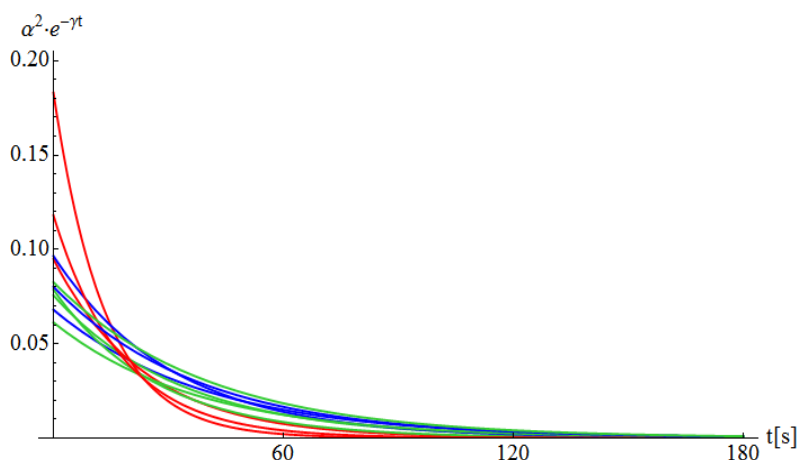
U dosadašnjim istraživanjima u kojima se karakteriziralo gibanje stanica koristeći različite varijante Langevinovog modela nasumičnog gibanja parametri su se određivali na cijelim populacijama stanica (Li i sur., 2008; Selmeczi i sur., 2008, 2005; Takagi i sur., 2008). Izuzetak su Li i suradnici (2011) koji su, nasuprot prethodno navedenim radovima, parametre Langevinovog modela gibanja računali za svaku pojedinu stanicu. Zbog potrebe karakterizacije mutiranog soja, ali i primijećene heterogenosti u načinu gibanja stanica unutar pojedinih bioloških populacija, odlučili smo se za kompromis između prethodno spomenuta dva pristupa. Stanice svake biološke populacije razvrstali smo u skupine unutar kojih se nalaze stanice slične po načinu gibanja te zatim tako definirane podskupine karakterizirali parametrima Langevinovog modela.

Prije nego što smo se odlučili za oblik poopćene Langevinove jednadžbe opisan u poglavlju 2.6.1. („Materijali i metode“), probali smo opisati gibanje promatranih populacija stanica s nekoliko različitih oblika proširenog Langevinovog modela. Ovi modeli međusobno se razlikuju u definiciji parametara $\beta(v)$ i $\sigma(v)$, koji su opisani konstantom, polinomom prvog ili polinomom drugog stupnja. Spomenuti različiti oblici Langevinovog modela prikazani su hijerarhijski na slici 10.2. (poglavljje „Prilozi“), a njima pripadajuće ciljne funkcije i vrijednosti parametara u tablicama 10.1. do 10.4. Najboljim se pokazao model definiran s $\beta(v) = \beta_0 + \beta_1 v$ te $\sigma_{\parallel}(v) = \sigma_{\parallel 0} + \sigma_{\parallel 1} v + \sigma_{\parallel 2} v^2$ i $\sigma_{\perp}(v) = \sigma_{\perp 0} + \sigma_{\perp 1} v + \sigma_{\perp 2} v^2$ (naveden pod rednim brojem 4. u tablicama 10.1. do 10.4.). Uvođenje dodatnog člana β_2 nije doprinjelo poboljšanju fita.

4.3.1. Parametri identificiranih podskupina stanica

Kao što je vidljivo iz rezultata prikazanih u tablicama 3.3., 3.4. i 3.5. (poglavljje „Rezultati“), vrijednosti parametra α nešto su veće u skupini stanica s jakim signalom na niskim frekvencijama (0.183 s^{-1} , 0.118 s^{-1} i 0.095 s^{-1} , naspram 0.097 s^{-1} , 0.080 s^{-1} , 0.068 s^{-1} za stanice velikih brzina i 0.083 s^{-1} , 0.079 s^{-1} i 0.076 s^{-1} i 0.061 s^{-1} za stanice malih brzina). Vrijednosti parametra γ su također nešto veće u skupini stanica s jakim signalom na niskim frekvencijama (0.074 s^{-1} , 0.056 s^{-1} i 0.042 s^{-1} , naspram 0.032 s^{-1} , 0.026 s^{-1} i 0.025 s^{-1} za stanice velikih brzina, te 0.037 s^{-1} , 0.030 s^{-1} , 0.027 s^{-1} i 0.025 s^{-1} za stanice malih brzina).

Utjecaj navedenih parametara na rezultantu akceleraciju opisanu proširenom Langevinovom jednadžbom prikazan je na slici 4.1.



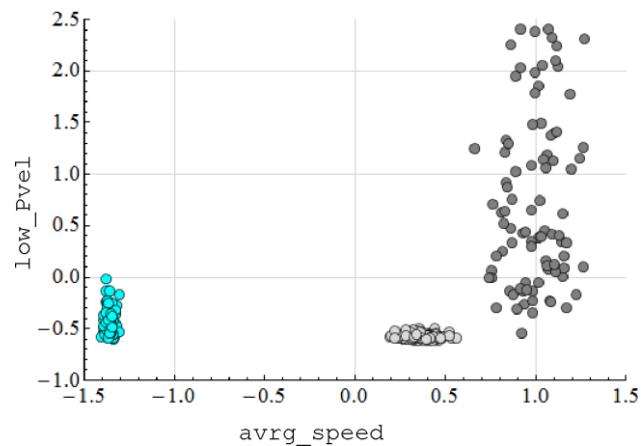
Slika 4.1. Funkcija $\alpha^2 \cdot e^{-\gamma t}$, definirana parametrima navedenim u tablicama 3.3. do 3.5. u ovisnosti o vremenu. Boje odgovaraju identificiranim skupinama stanicama, po istoj legendi kao na slici 3.8.

Viša vrijednost parametra α u skupini stanica s jakim signalom na niskim frekvencijama ima kao posljedicu veći udio memorijskog člana u vrijednosti ukupne akceleracije s obzirom na smjer i brzinu kretanja stanice u prethodnih 15 sekundi. Na intervalima većim od 15 sekundi, međutim, udio memorijskog člana u vrijednosti akceleracije naglo pada zbog visoke vrijednosti parametra γ . Brži pad krivulje koja opisuje kratkotrajnu memoriju stanica u navedenoj skupini ukazuje na korelaciju parametara α i γ s oscilacijama koje se pojavljuju pri većim vremenskim intervalima, uočeni u dijelu vegetativnih AX2 stanica (14% populacije), agregacijski kompetentnih AX2 stanica (16% populacije) i vegetativnih CI/CII stanica (21% populacije; tablica 3.2.). Uočena periodičnost rezultat je združenog utjecaja parametara α i γ , te parametara funkcije $\beta(v)$ (Shenderov i Sheetz, 1997). Parametar β_0 , koji sudjeluje u ograničavanju porasta brzine, također ima više vrijednosti u skupini stanica s jakim signalom na niskim frekvencijama (0.434 s^{-1} , 0.202 s^{-1} i 0.202 s^{-1} naspram 0.172 s^{-1} , 0.084 s^{-1} i 0.062 s^{-1} za stanice velikih brzina te 0.177 s^{-1} , 0.192 s^{-1} , 0.079 s^{-1} i 0.102 s^{-1} za stanice malih brzina). Langevinov model opisan navedenim parametrima dobro reproducirana uočenu periodičnost, kao što se vidi iz usporedbe periodograma simuliranih i referentnih bioloških populacija na slikama 10.10., 10.11. i 10.12.

Vrijednosti parametra paralelne komponente šuma, neovisnog o brzini, $\sigma_{\parallel 0}$, veće su u populacijama stanica velikih brzina gibanja ($0.694 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$, $1.206 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$ i $1.205 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$ naspram $0.291 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$, $0.356 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$, $0.169 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$ i $0.285 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$ za stanice malih brzina te $0.246 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$, $0.461 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$, $0.183 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2/3}$ za stanice s jakim signalom na niskim frekvencijama), što odgovara pretpostavci modela da član koji sadrži nasumični šum opisuje glavnu pokretačku silu gibanja.

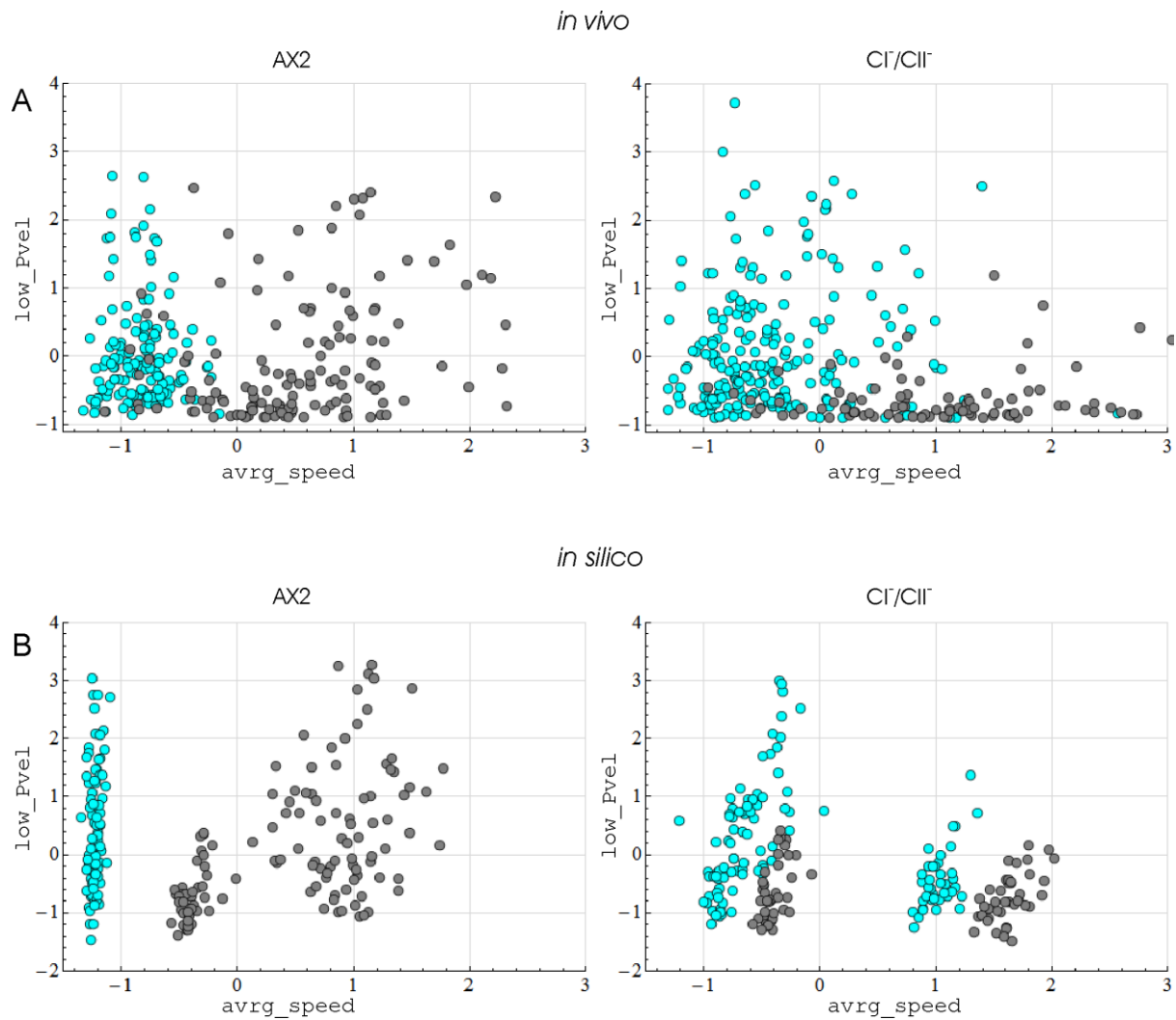
Navedeni parametri dobiveni su korištenjem sličnog oblika Langevinovog modela kao i u radu Takagi i suradnika (2008), osim što je u našem slučaju $\beta(v)$ polinom prvog, a ne drugog stupnja, a σ_0 nije ista za paralelnu i okomitu komponentu. U njihovom radu stopa memorije α imala je vrijednosti 0.340 s^{-1} za vegetativne, te 0.098 s^{-1} za agregacijski kompetentne AX2 stanice. Vrijednosti parametra α određenih u ovom radu kreću se u rasponu $0.079 - 0.183 \text{ s}^{-1}$ za vegetativne, te $0.068 - 0.095 \text{ s}^{-1}$ za agregacijski kompetentne AX2 stanice, što ukazuje na isti trend smanjenja vrijednosti α kod agregacijski kompetentnih stanica. U radu navedenih autora, stopa gubitka memorije γ imala je vrijednosti 0.095 s^{-1} za vegetativne, te 0.029 s^{-1} za agregacijski kompetentne stanice. Vrijednosti parametra γ određenih u ovom radu kreću se u rasponu $0.037 - 0.074 \text{ s}^{-1}$ za vegetativne, te $0.025 - 0.042 \text{ s}^{-1}$ za agregacijski kompetentne AX2 stanice, što opet ukazuje na isti trend, u ovom slučaju smanjenja vrijednosti γ , kod agregacijski kompetentnih stanica.

Radi usporedbe ovih dvaju pristupa u karakterizaciji populacija stanica, od kojih jedan promatra pojedinu biološku populaciju kao homogenu cjelinu, a drugi kao heterogenu cjelinu sastavljenu od više homogenih skupina, karakterizirali smo i trajektorije simulirane parametrima iz rada Takagi i suradnika (2008) varijablama korištenim u ovom istraživanju za klasifikaciju stanica (varijable *avrg_speed* i *low_Pvel*, definirane kao normalizirane vrijednosti srednje trenutne brzine stanica, odnosno sume amplituda periodograma u području niskih frekvencija). Razmještaj „stanica“ simuliranih prema parametrima iz navedenog rada u prostoru varijabli *avrg_speed* i *low_Pvel* prikazan je na slici 4.2. Radi provjere utjecaja memorijskog člana, dodana je i treća populacija, koju čine trajektorije simulirane parametrima za agregacijski kompetentne stanice, ali s parametrom α postavljenim na vrijednost 0.



Slika 4.2. Vrijednosti varijabli *avrg_speed* i *low_Pvel* za trajektorije simulirane prema modelu i parametrima iz rada Takagi i suradnika (2008). **Plavo:** trajektorije simulirane prema parametrima vegetativnih AX2 stanica; **sivo:** trajektorije simulirane prema parametrima agregacijski kompetentnih AX2 stanica; **svjetlo sivo:** trajektorije simulirane prema parametrima agregacijski kompetentnih AX2 stanica, ali s postavljanjem stope memorije α na 0.

Za razliku od jasno odvojenih populacija stanica prikazanih na slici 4.2., biološke populacije stanica analizirane u ovom istraživanju izgledaju puno heterogenije promatrano u prostoru varijabli *avrg_speed* i *low_Pvel* (slika 4.3.a). Kada simuliramo trajektorije modelom korištenim u ovom radu, a koji je definiran parametrima prikazanim u poglavlju “Rezultati” (tablice 3.3. do 3.5.), dobivamo populacije “stanica” čiji smještaj u prostoru dviju varijabli bolje odgovara referentnim biološkim populacijama, uz nešto manji rasap vrijednosti (slika 4.3.b).



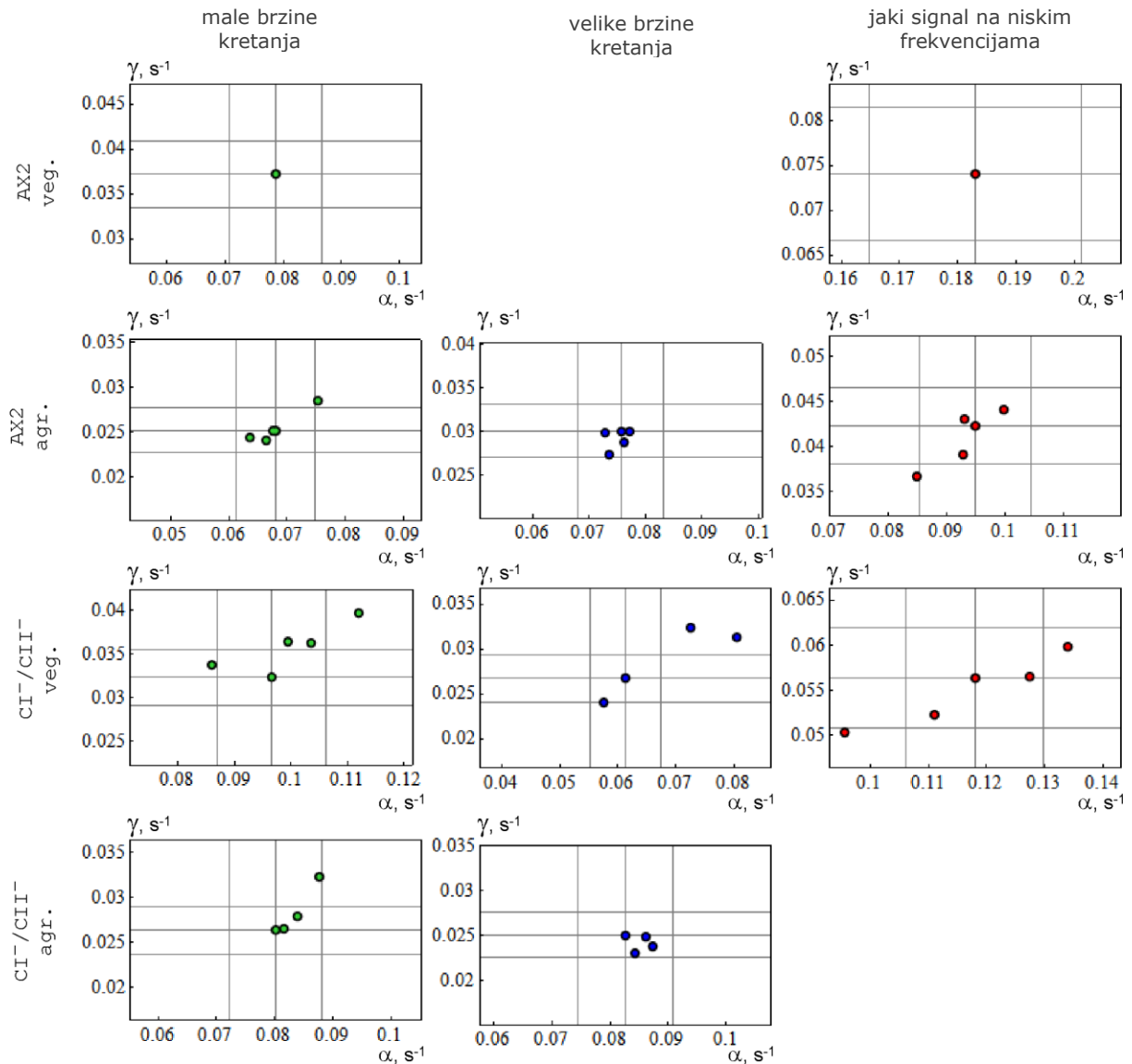
Slika 4.3. Trajektorije u prostoru varijabli *avrg_speed* i *low_Pvel*:

(A) trajektorije dobivene praćenjem gibanja stanice sojeva AX2 i CI/CII u različitim fazama životnog ciklusa; (B) trajektorije simulirane prema parametrima navedenim u tablicama 3.3. do 3.5.

Plavo su označene vegetativne stanice, a **sivo** agregacijski kompetentne stanice.

4.3.2. Različiti oblici poopćenog Langevinovog modela

Zanimljivo je da korištenjem različito definiranih poopćenih Langevinovih modela, u karakterizaciji gibanja stanica pojedine podskupine, dolazimo do sličnih vrijednosti parametara α i γ (tablice 10.1. do 10.4.). Na slici 4.4. prikazane su vrijednosti parametara α i γ ostalih isprobanih oblika Langevinovog modela (poglavlje 2.6.1) u usporedbi s parametrima dobivenim modelom korištenim u ovom istraživanju. Iz ove analize izostavljen je model čije su β i σ neovisne o brzini.



Slika 4.4. Vrijednosti parametara α i γ dobivenih karakterizacijom podskupina stanica različitim oblicima poopćenog Langevinovog modela, opisanim u poglavlju 2.6.1. U središtu grafa prikazana je točka definirana vrijednostima parametara α i γ iz tablice 3.3., a 4 središnja kvadranta određena prikazanim linijama obuhvaćaju raspon od $\pm 10\%$ od tih vrijednosti.

Uski rasap parametara dobivenih korištenjem različitih modela najviše dolazi do izražaja u podskupinama agregacijski kompetentnih AX2 stanica, gdje se sve vrijednosti parametara α i γ razlikuju za manje od 11% od vrijednosti dobivenih izabranim modelom, međutim i podskupine vegetativnih i agregacijski kompetentnih CI/CII stanica pokazuju dobro slaganje parametara α i γ između različitih korištenih oblika Langevinovih modela. Međutim, do

velikog rasapa navedenih parametara među različitim modelima dolazi kod podskupina vegetativnih AX2 stanica. Razlog tome vjerojatno leži u raspodjeli brzina ovih stanica, koje se zbog malih pomaka nalaze u području podložnom utjecaju pogrešaka određivanja položaja centroide, uzrokovanih algoritmom praćenja, varijacijama oblika stanice ili fluktuacijama intenziteta osvjjetljenja koje utječu na mikroskopiju tamnog polja.

4.3.3. Daljnje smjernice

U budućim istraživanjima svakako bi bilo zanimljivo isključiti heterogenost agregacijski kompetentnih stanica koja proizlazi iz različitosti faza staničnog ciklusa u kojima se stanice nalaze u trenutku nestanka izvora hrane. Jedan od mogućih načina je sinhronizacija populacije stanica privremenim zadržavanjem na sniženoj temperaturi, nakon čega se, vraćanjem na optimalnu temperaturu, stanice nalaze u približno istoj fazi staničnog ciklusa (Maeda i sur., 1989). Osim toga, zanimljivo bi bilo kontrolirano fiksirati određene parametre modela prema očekivanim biološkim značajkama koje se namjeravaju kvantitativno usporediti. Memorijski član Langevinovog modela mogao bi se raspisati kao suma tri memorijska člana s konstantama γ_1 , γ_2 i γ_3 , koje bi odgovarale prethodno uočenim vremenskim skalama kod protista *D. discoideum*, te bi se na taj način mogli dobiti parametri α_1 , α_2 i α_3 koji bi sugerirali snagu memorije stanice na kraćim (nastanak pseudopodija), srednjim (veća vjerojatnost nastanka „split“ pseudopodija) i duljim vremenskim periodima (ustrajno pravocrtno gibanje stanice koje omogućuje kontinuiranu orijentaciju stanice prema pulsovima kemoatraktanta).

5. Zaključci

Kretanje stanica *D. discoideum* praćeno je koristeći novo osmišljenu konfiguraciju za mikroskopiju tamnog polja realiziranu pomoću kondenzora za mikroskopiju faznog kontrasta i objektiva male numeričke aperture. Automatiziranom računalnom analizom tako dobivenih vremenskih serija slika rekonstruirane su trajektorije praćenih stanica.

Gibanje stanica soja CI/CII u homogenoj okolini bez prisustva vanjskih signala uspoređeno je s gibanjem stanica divljeg tipa, AX2, i to u dvjema različitim fazama životnog ciklusa – vegetativnoj i agregacijski kompetentnoj. U navedenim uvjetima stanice CI/CII imaju značajno veću trenutnu brzinu gibanja od stanica AX2, i to u obje faze životnog ciklusa. Unatoč povećanoj trenutnoj brzini, populacija agregacijski kompetentnih CI/CII stanica u istom vremenu prelazi manje udaljenosti od agregacijski kompetentnih stanica divljeg tipa. Objе navedene fenotipske karakteristike stanica soja CI/CII mogu se povezati sa smanjenom inhibicijom lateralnih pseudopodija stanica deficitarnih za korteksiline. Povećanom učestalošću nastanka lateralnih pseudopodija stanica postaje dinamičnija i pokretljivija, međutim, uz nefunkcionalni sustav kontrole polarizacije, ona ne može održati usmjerenost gibanja što dolazi do izražaja u agregacijski kompetentnoj fazi.

Nenadziranom klasifikacijom svih promatranih stanica na temelju njihovih individualnih karakteristika gibanja, identificirane su tri skupine stanica koje se razlikuju prvenstveno po srednjoj brzini kretanja i niskofrekventnom području u periodogramu vektora brzine. Pokazalo se da je, za razliku od vegetativnih AX2 stanica, dio vegetativnih CI/CII stanica svrstan u skupinu velikih prosječnih brzina. Osim toga, u populaciji agregacijski kompetentnih CI-/CII- stanica, niti jedna stanica nije svrstana u skupinu s velikim udjelom niskih frekvencija, što bi se moglo objasniti odsustvom dugotrajnog „pamćenja“ smjera gibanja tih stanica s izmijenjenim molekularnim sastavom aktinskog citoskeleta.

Sve identificirane podskupine karakterizirane su parametrima poopćenog Langevinovog modela gibanja. Osim toga, napravljena je i usporedba uspješnosti optimizacije za šest različitih varijanti proširenog Langevinovog modela za svaku od podskupina stanica, te je ustanovljeno kako jedna od ispitanih varijanti daje konzistentno najbolje rezultate za sve podskupine. Usporedba parametara modela svih deset identificiranih podskupina stanica pokazala je veću međusobnu sličnost stanica unutar skupina dobivenih prvotnom klasifikacijom, od sličnosti stanica koje pripadaju istoj biološkoj populaciji. Time je potvrđena opravdanost početne podjele heterogenih bioloških populacija u skupine stanica sličnog načina gibanja.

6. Literatura

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Science, New York.
2. Ananthakrishnan, R., Ehrlicher, A., 2007. The forces behind cell movement. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 303–317.
3. Antolović, V., Marinović, M., Filić, V., Weber, I., 2014. A simple optical configuration for cell tracking by dark-field microscopy. *J. Microbiol. Methods* 104, 9–11.
4. Azhar, M., Kennady, P.K., Pande, G., Espiritu, M., Holloman, W., Brazill, D., Gomer, R.H., Nanjundiah, V., 2001. Cell cycle phase, cellular Ca²⁺ and development in *Dictyostelium discoideum*. *Int. J. Dev. Biol.* 45, 405–414.
5. Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Imhof, B.A., 1998. Actin dynamics in living mammalian cells. *J. Cell Sci.* 111, 1649–1658.
6. Bamburg, J.R., 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 185–230.
7. Barišić, K., Weber, I., 2004. *Dictyostelium discoideum*: a model organism on the eve of the genome sequencing completion. *Period. Biol.* 106, 103–114.
8. Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V., Wang, Y.L., 2001. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J. Cell Biol.* 153, 881–888.
9. Bloomfield, G., Tanaka, Y., Skelton, J., Ivens, A., Kay, R.R., 2008. Widespread duplications in the genomes of laboratory stocks of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Biol.* 9, R75.
10. Bolourani, P., Spiegelman, G.B., Weeks, G., 2006. Delineation of the Roles Played by RasG and RasC in cAMP-dependent Signal Transduction during the Early Development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* 17, 4543–4550.
11. Bosgraaf, L., Van Haastert, P.J.M., 2009. The ordered extension of pseudopodia by amoeboid cells in the absence of external cues. *PLoS One* 4, e5253.
12. Carlier, M.-F., 2010. *Actin-based Motility: Cellular, Molecular and Physical Aspects*. Springer, New York.
13. Carlier, M.F., Jean, C., Rieger, K.J., Lenfant, M., Pantaloni, D., 1993. Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5034–5038.
14. Cha, I., Jeon, T.J., 2011. Dynamic localization of the actin-bundling protein cortexillin I during cell migration. *Mol. Cells* 32, 281–287.
15. Cooper, J.A., Schafer, D.A., 2000. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 97–103.

16. DeMali, K.A., Burridge, K., 2003. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J. Cell Sci.* 116, 2389–2397.
17. Dent, E.W., Gertler, F.B., 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209–227.
18. DiMilla, P.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M., Lauffenburger, D.A., 1992. Measurement of individual cell migration parameters for human tissue cells. *AIChE J.* 38, 1092–1104.
19. Dormann, D., Siegert, F., Weijer, C.J., 1996. Analysis of cell movement during the culmination phase of *Dictyostelium* development. *Dev. Camb. Engl.* 122, 761–769.
20. Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J., 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83, 433–473.
21. Dunn, G.A., 1983. Characterising a kinesis response: time averaged measures of cell speed and directional persistence. *Agents Actions. Suppl.* 12, 14–33.
22. Dunn, G.A., Brown, A.F., 1987. A unified approach to analysing cell motility. *J. Cell Sci. Suppl.* 8, 81–102.
23. Eichinger, L., 2003. Revamp a model-status and prospects of the *Dictyostelium* genome project. *Curr. Genet.* 44, 59–72.
24. Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Loulseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabbinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B., Kuspa, A., 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435, 43–57.
25. Einstein, A., 1956. Investigations on the theory of the Brownian movement, edited by R. Fürth, translated by A.D. Cowper. Dover publications, Inc., New York.
26. Evans, J.H., Falke, J.J., 2007. Ca²⁺ influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16176–16181.
27. Faix, J., 2002. The actin-bundling protein cortexillin is the downstream target of a Rac1-signaling pathway required for cytokinesis. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23, 765–772.

28. Faix, J., Clougherty, C., Konzok, A., Mintert, U., Murphy, J., Albrecht, R., Mühlbauer, B., Kuhlmann, J., 1998. The IQGAP-related protein DGAP1 interacts with Rac and is involved in the modulation of the F-actin cytoskeleton and control of cell motility. *J. Cell Sci.* 111, 3059–3071.
29. Faix, J., Steinmetz, M., Boves, H., Kammerer, R.A., Lottspeich, F., Mintert, U., Murphy, J., Stock, A., Aebi, U., Gerisch, G., 1996. Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail. *Cell* 86, 631–642.
30. Faix, J., Weber, I., Mintert, U., Köhler, J., Lottspeich, F., Marriott, G., 2001. Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *EMBO J.* 20, 3705–3715.
31. Filić, V., Marinović, M., Faix, J., Weber, I., 2012. A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *J. Cell Sci.* 125, 387–398.
32. Filić, V., Marinović, M., Faix, J., Weber, I., 2014. The IQGAP-related protein DGAP1 mediates signaling to the actin cytoskeleton as an effector and a sequestrator of Rac1 GTPases. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2775–2785.
33. Friedl, P., Borgmann, S., Bröcker, E.B., 2001. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J. Leukoc. Biol.* 70, 491–509.
34. Friedl, P., Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362–374.
35. Frigo, M., Johnson, S.G., 2005. The Design and Implementation of FFTW3. *Proceedings of the IEEE.* pp. 216–231.
36. Fuchs, M., Jones, M.K., Williams, K.L., 1993. Characterization of An Epithelium-Like Layer of Cells in the Multicellular Dictyostelium-Discoideum Slug. *J. Cell Sci.* 105, 243–253.
37. Gail, M.H., Boone, C.W., 1970. The locomotion of mouse fibroblasts in tissue culture. *Biophys. J.* 10, 980–993.
38. Girard, K.D., Chaney, C., Delannoy, M., Kuo, S.C., Robinson, D.N., 2004. Dynacortin contributes to cortical viscoelasticity and helps define the shape changes of cytokinesis. *EMBO J.* 23, 1536–1546.
39. Goldbeter, A., 2006. Oscillations and waves of cyclic AMP in Dictyostelium: a prototype for spatio-temporal organization and pulsatile intercellular communication. *Bull. Math. Biol.* 68, 1095–1109.
40. Goley, E.D., Welch, M.D., 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 713–726.
41. Goury-Sistla, P., Nanjundiah, V., Pande, G., 2012. Bimodal distribution of motility and cell fate in Dictyostelium discoideum. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 263–272.

42. Häder, D.-P., Claviez, M., Merkl, R., Gerisch, G., 1983. Responses of *Dictyostelium discoideum* amoebae to local stimulation by light. *Cell Biol. Int. Rep.* 7, 611–616.
43. Hartman, R.S., Lau, K., Chou, W., Coates, T.D., 1994. The fundamental motor of the human neutrophil is not random: evidence for local non-Markov movement in neutrophils. *Biophys. J.* 67, 2535–2545.
44. Haw, M.D., 2002. Colloidal suspensions, Brownian motion, molecular reality: a short history. *J. Phys. Condens. Matter* 14, 7769.
45. Howard, J., 2001. *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Publishers, Sunderland, Mass.
46. Insall, R.H., Kuspa, A., Lilly, P.J., Shaulsky, G., Levin, L.R., Loomis, W.F., Devreotes, P., 1994. CRAC, a cytosolic protein containing a pleckstrin homology domain, is required for receptor and G protein-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 126, 1537–1545.
47. Jay, P.Y., Pham, P.A., Wong, S.A., Elson, E.L., 1995. A mechanical function of myosin II in cell motility. *J. Cell Sci.* 108, 387–393.
48. Jeon, T.J., Lee, D.-J., Merlot, S., Weeks, G., Firtel, R.A., 2007. Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II. *J. Cell Biol.* 176, 1021–1033.
49. Köhler, S., Bausch, A.R., 2012. Contraction mechanisms in composite active actin networks. *PloS One* 7, e39869.
50. Kreis, T., Vale, R., 1998. *Guidebook to cytoskeletal and motor proteins*. Oxford University Press, Oxford.
51. Kurosaka, S., Kashina, A., 2008. *Cell Biology of Embryonic Migration*. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 84, 102–122.
52. Lämmermann, T., Sixt, M., 2009. Mechanical modes of “amoeboid” cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 636–644.
53. Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F., 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359–369.
54. Lee, S., Shen, Z., Robinson, D.N., Briggs, S., Firtel, R.A., 2010. Involvement of the cytoskeleton in controlling leading-edge function during chemotaxis. *Mol. Biol. Cell* 21, 1810–1824.
55. Lemons, D.S., Gythiel, A., 1997. Paul Langevin’s 1908 paper “On the Theory of Brownian Motion” [“Sur la théorie du mouvement brownien,” *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 146, 530–533 (1908)]. *Am. J. Phys.* 65, 1079–1081.
56. Li, L., Cox, E.C., Flyvbjerg, H., 2011. “Dicty dynamics”: *Dictyostelium* motility as persistent random motion. *Phys. Biol.* 8, 046006.

57. Li, L., Nørrelykke, S.F., Cox, E.C., 2008. Persistent cell motion in the absence of external signals: a search strategy for eukaryotic cells. *PLoS One* 3, e2093.
58. Liu, X., Shu, S., Yu, S., Lee, D.-Y., Piszczek, G., Gucek, M., Wang, G., Korn, E.D., 2014. Biochemical and biological properties of cortexillin III, a component of *Dictyostelium* DGAP1-cortexillin complexes. *Mol. Biol. Cell* 25, 2026–2038.
59. Lombardi, M.L., Knecht, D.A., Dembo, M., Lee, J., 2007. Traction force microscopy in *Dictyostelium* reveals distinct roles for myosin II motor and actin-crosslinking activity in polarized cell movement. *J. Cell Sci.* 120, 1624–1634.
60. Losick, R., Desplan, C., 2008. Stochasticity and cell fate. *Science* 320, 65–68.
61. Low, J., Huang, S., Blosser, W., Dowless, M., Burch, J., Neubauer, B., Stancato, L., 2008. High-content imaging characterization of cell cycle therapeutics through in vitro and in vivo subpopulation analysis. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2455–2463.
62. Maeda, M., Lu, S., Shaulsky, G., Miyazaki, Y., Kuwayama, H., Tanaka, Y., Kuspa, A., Loomis, W.F., 2004. Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science* 304, 875–878.
63. Maeda, Y., 2005. Regulation of growth and differentiation in *Dictyostelium*. *Int. Rev. Cytol.* 244, 287–332.
64. Maeda, Y., 2011. Cell-cycle checkpoint for transition from cell division to differentiation. *Dev. Growth Differ.* 53, 463–481.
65. Maeda, Y., Ohmori, T., Abe, T., Abe, F., Amagai, A., 1989. Transition of starving *Dictyostelium* cells to differentiation phase at a particular position of the cell cycle. *Differ. Res. Biol. Divers.* 41, 169–175.
66. Magnani, A., Priamo, A., Pasqui, D., Barbucci, R., 2003. Cell behaviour on chemically microstructured surfaces. *Mater. Sci. Eng. C* 23, 315–328.
67. Maheshwari, G., Lauffenburger, D.A., 1998. Deconstructing (and reconstructing) cell migration. *Microsc. Res. Tech.* 43, 358–368.
68. Mogilner, A., Oster, G., 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys. J.* 71, 3030–3045.
69. Mondal, S., Burgute, B., Rieger, D., Muller, R., Rivero, F., Faix, J., Schleicher, M., Noegel, A.A., 2010. Regulation of the Actin Cytoskeleton by an Interaction of IQGAP Related Protein GAPA with Filamin and Cortexillin I. *PLoS One* 5, e15440.
70. Moores, S.L., Sabry, J.H., Spudich, J.A., 1996. Myosin dynamics in live *Dictyostelium* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 443–446.
71. Müller-Taubenberger, A., Kortholt, A., Eichinger, L., 2013. Simple system – substantial share: the use of *Dictyostelium* in cell biology and molecular medicine. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 45–53.
72. Ornstein, L.S., 1919. On the Brownian motion. *Proc. R. Acad. Amst.* 21, 96–108.

73. Pan, P., Hall, E.M., Bonner, J.T., 1972. Folic Acid as Second Chemotactic Substance in the Cellular Slime Moulds. *Nature* 237, 181–182.
74. Parent, C.A., 2004. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 4–13.
75. Parsons, J.T., Horwitz, A.R., Schwartz, M.A., 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 633–643.
76. Pluta, M., 1989. *Advanced light microscopy: Specialized methods. Vol. 2.* PWN-Polish Scientific Publishers.
77. Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
78. Pollard, T.D., Mooseker, M.S., 1981. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* 88, 654–659.
79. Pollitt, A.Y., Blagg, S.L., Ibarra, N., Insall, R.H., 2006. Cell motility and SCAR localisation in axenically growing *Dictyostelium* cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 1091–1098.
80. Rafelski, S.M., Theriot, J.A., 2004. Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 209–239.
81. Raper, K.B., 1935. *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric. Res.* 50, 135–147.
82. Reichl, E.M., Ren, Y., Mophew, M.K., Delannoy, M., Effler, J.C., Girard, K.D., Divi, S., Iglesias, P.A., Kuo, S.C., Robinson, D.N., 2008. Interactions between myosin and actin crosslinkers control cytokinesis contractility dynamics and mechanics. *Curr. Biol.* 18, 471–480.
83. Ren, Y., Effler, J.C., Norstrom, M., Luo, T., Firtel, R.A., Iglesias, P.A., Rock, R.S., Robinson, D.N., 2009. Mechanosensing through cooperative interactions between myosin II and the actin crosslinker cortexillin I. *Curr. Biol. CB* 19, 1421–1428.
84. Rivero, F., Furukawa, R., Fechheimer, M., Noegel, A.A., 1999. Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 112, 2737–2751.
85. Sackmann, E., 1994. Intra- and extracellular macromolecular networks: physics and biological function. *Macromol. Chem. Phys.* 195, 7–28.
86. Sasaki, A.T., Chun, C., Takeda, K., Firtel, R.A., 2004. Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement. *J. Cell Biol.* 167, 505–518.
87. Sbalzarini, I.F., Koumoutsakos, P., 2005. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *J. Struct. Biol.* 151, 182–195.

88. Schilde, C., Araki, T., Williams, H., Harwood, A., Williams, J.G., 2004. GSK3 is a multifunctional regulator of Dictyostelium development. *Dev. Camb. Engl.* 131, 4555–4565.
89. Schroth-Diez, B., Gerwig, S., Ecke, M., Hegerl, R., Diez, S., Gerisch, G., 2009. Propagating waves separate two states of actin organization in living cells. *HFSP J.* 3, 412–427.
90. Segall, J.E., Fisher, P.R., Gerisch, G., 1987. Selection of chemotaxis mutants of Dictyostelium discoideum. *J. Cell Biol.* 104, 151–161.
91. Selmeczi, D., Li, L., Pedersen, L.I.I., Nrrclykke, S.F., Hagedorn, P.H., Mosler, S., Larsen, N.B., Cox, E.C., Flyvbjerg, H., 2008. Cell motility as random motion: A review. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 157, 1–15.
92. Selmeczi, D., Mosler, S., Hagedorn, P.H., Larsen, N.B., Flyvbjerg, H., 2005. Cell Motility as Persistent Random Motion: Theories from Experiments. *Biophys. J.* 89, 912–931.
93. Shannon, K.B., 2012. IQGAP Family Members in Yeast, Dictyostelium, and Mammalian Cells. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 894817.
94. Shenderov, A.D., Sheetz, M.P., 1997. Inversely correlated cycles in speed and turning in an ameba: an oscillatory model of cell locomotion. *Biophys. J.* 72, 2382–2389.
95. Shu, S., Liu, X., Kriebel, P.W., Daniels, M.P., Korn, E.D., 2012. Actin cross-linking proteins cortexillin I and II are required for cAMP signaling during Dictyostelium chemotaxis and development. *Mol. Biol. Cell* 23, 390–400.
96. Simson, R., Wallraff, E., Faix, J., Niewöhner, J., Gerisch, G., Sackmann, E., 1998. Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of Dictyostelium lacking talin or cortexillins. *Biophys. J.* 74, 514–522.
97. Slack, M.D., Martinez, E.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J., 2008. Characterizing heterogeneous cellular responses to perturbations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19306–19311.
98. Srinivasan, K., Wright, G.A., Hames, N., Housman, M., Roberts, A., Aufderheide, K.J., Janetopoulos, C., 2013. Delineating the core regulatory elements crucial for directed cell migration by examining folic-acid-mediated responses. *J. Cell Sci.* 126, 221–233.
99. Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., Stradal, T.E.B., 2006. Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol. Biol. Cell* 17, 2581–2591.
100. Steinmetz, M.O., Stock, A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Faix, J., Gerisch, G., Aebi, U., Kammerer, R.A., 1998. A distinct 14 residue site triggers coiled-coil formation in cortexillin I. *EMBO J.* 17, 1883–1891.

101. Stock, A., Steinmetz, M.O., Janmey, P.A., Aebi, U., Gerisch, G., Kammerer, R.A., Weber, I., Faix, J., 1999. Domain analysis of cortexillin I: actin-bundling, PIP(2)-binding and the rescue of cytokinesis. *EMBO J.* 18, 5274–5284.
102. Stokes, C.L., Lauffenburger, D.A., Williams, S.K., 1991. Migration of individual microvessel endothelial cells: stochastic model and parameter measurement. *J. Cell Sci.* 99, 419–430.
103. Storn, R., Price, K., 1997. Differential Evolution - A Simple and Efficient Heuristic for Global Optimization over Continuous Spaces. *J Glob. Optim.* 11, 341–359.
104. Stossel, T.P., 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260, 1086–1094.
105. Suraneni, P., Rubinstein, B., Unruh, J.R., Durnin, M., Hanein, D., Li, R., 2012. The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *J. Cell Biol.* 197, 239–251.
106. Takagi, H., Sato, M.J., Yanagida, T., Ueda, M., 2008. Functional Analysis of Spontaneous Cell Movement under Different Physiological Conditions. *PLoS One* 3, e2648.
107. Tyson, J.J., Murray, J.D., 1989. Cyclic AMP waves during aggregation of *Dictyostelium amoebae*. *Development* 106, 421–426.
108. Uhlenbeck, G.E., Ornstein, L.S., 1930. On the Theory of the Brownian Motion. *Phys. Rev.* 36, 823–841.
109. Van Haastert, P.J.M., 2011. Amoeboid Cells Use Protrusions for Walking, Gliding and Swimming. *PLoS One* 6, e5253.
110. Veronika, M., Evans, J., Matsudaira, P., Welsch, R., Rajapakse, J., 2009. Sub-population analysis based on temporal features of high content images. *BMC Bioinformatics* 10 Suppl 15, S4.
111. Wang, N., Suo, Z., 2005. Long-distance propagation of forces in a cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1133–1138.
112. Weber, I., 2006. Is there a pilot in a pseudopod? *Eur. J. Cell Biol.* 85, 915–924.
113. Weber, I., Gerisch, G., Heizer, C., Murphy, J., Badelt, K., Stock, A., Schwartz, J.-M., Faix, J., 1999. Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into the cleavage furrow. *EMBO J.* 18, 586–594.
114. Weber, I., Neujahr, R., Du, A., Köhler, J., Faix, J., Gerisch, G., 2000. Two-step positioning of a cleavage furrow by cortexillin and myosin II. *Curr. Biol.* 10, 501–506.
115. Wessels, D., Soll, D.R., Knecht, D., Loomis, W.F., De Lozanne, A., Spudich, J., 1988. Cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium amebae* lacking myosin heavy chain. *Dev. Biol.* 128, 164–177.

116. Williams, R.S.B., Boeckeler, K., Gräf, R., Müller-Taubenberger, A., Li, Z., Isberg, R.R., Wessels, D., Soll, D.R., Alexander, H., Alexander, S., 2006. Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol. Med.* 12, 415–424.
117. Winder, S.J., Ayscough, K.R., 2005. Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* 118, 651–654.
118. Witke, W., Schleicher, M., Noegel, A.A., 1992. Redundancy in the microfilament system: abnormal development of *Dictyostelium* cells lacking two F-actin cross-linking proteins. *Cell* 68, 53–62.
119. Xiong, Y., Rangamani, P., Fardin, M.-A., Lipshtat, A., Dubin-Thaler, B., Rossier, O., Sheetz, M.P., Iyengar, R., 2010. Mechanisms Controlling Cell Size and Shape during Isotropic Cell Spreading. *Biophys. J.* 98, 2136–2146.
120. Zang, J.H., Cavet, G., Sabry, J.H., Wagner, P., Moores, S.L., Spudich, J.A., 1997. On the role of myosin-II in cytokinesis: division of *Dictyostelium* cells under adhesive and nonadhesive conditions. *Mol. Biol. Cell* 8, 2617–2629.

7. Sažetak

Gibanje pojedinačnih stanica bitna je sastavnica fiziologije i patologije višestaničnih organizama. Protist *Dictyostelium discoideum* već se dugo koristi u istraživanju staničnog gibanja kao prikladni modelni organizam za proučavanje komponenti aktinskog citoskeleta funkcionalno sačuvanih kroz čitavu domenu eukariota. Početna istraživanja staničnog gibanja bazirala su se na modelu Brownovog gibanja koji opisuje nasumično kretanje malih čestica u fluidu uzrokovano termičkim fluktuacijama. Sve preciznija mjerenja dovela su do otkrivanja svojstvenih pravilnosti u gibanju eukariotskih stanica i time potakla modifikacije i nadogradnju tog početnog modela. Glavni cilj ovog istraživanja bio je opisati gibanje stanica sojeva *D. discoideum* s izmijenjenim molekularnim sastavom aktinskog citoskeleta u okviru Langevinovog modela nasumičnog gibanja proširenog memorijskim članom. Drugi cilj istraživanja bio je istražiti moguću heterogenost pojedinih sojeva u različitim fazama razvojnog ciklusa s obzirom na način kretanja.

U ovom istraživanju promatrano je gibanje stanica dvaju sojeva *D. discoideum*, laboratorijskog divljeg tipa (AX2) i soja deficijentnog za korteksiline (CI/CII), u dvije različite faze životnog ciklusa – vegetativnoj fazi i agregacijski kompetentnoj fazi. Korteksilini su proteini koji usnopljuju aktinske filamente i unakrsno ih povezuju u trodimenzionalne strukture te imaju važnu ulogu u kontroli oblika stanice, pokretljivosti stanice i u staničnoj diobi. Osim navedenog, nedavna istraživanja sugeriraju njihovu ulogu u prijenosu signala u stanici, te inhibiciji polimerizacije aktina i nastanka pseudopodija.

Nestimulirano kretanje stanica *D. discoideum* praćeno je mikroskopijom tamnog polja pri malom povećanju. Iz dobivenih trajektorija određene su trenutne brzine stanica i srednja kvadratna udaljenost za svaku promatranu populaciju. Ustanovljeno je da stanice CI/CII imaju značajno veću brzinu gibanja od stanica AX2, i to u obje faze životnog ciklusa. S obzirom da je gibanje stanica praćeno uz vremensku rezoluciju od 0.5 s^{-1} , izmjerena brzina ne opisuje samo translokaciju tijela stanice već i dinamiku nastanka pseudopodija. Povećane trenutne brzine korteksilinskog mutanta vjerojatno su posljedica nedovoljne inhibicije nastanka pseudopodija na bočnim dijelovima stanične membrane. U prilog tome ide i manja prekrivena površina populacije agregacijski kompetentnih CI/CII stanica, unatoč većer trenutne brzine pojedinih stanica.

U svrhu ispitivanja heterogenosti pojedine biološke populacije, okarakterizirali smo svaku individualnu stanicu sa 14 parametara izvedenih iz raspodjele amplitude brzine te autokorelacije i periodograma vektora i amplitude brzine. S ovako izvedenim parametrima

koji kvantitativno opisuju gibanje proveli smo nenadziranu klasifikaciju na ukupnoj populaciji promatranih stanica. Ustanovljeno je da na raspodjelu stanica po skupinama dominantno utječu dva parametra: srednja brzina stanica i suma amplituda periodograma u niskofrekventnom području. Sve analizirane stanice podijelile su se u tri skupine: skupinu stanica s malom prosječnom brzinom, skupinu stanica s velikom prosječnom brzinom te skupinu stanica koja se od prve dvije razlikuje velikim udjelom signala na niskim frekvencijama. Promatranjem raspodjele bioloških populacija po induciranim skupinama uočeno je slijedeće: dio vegetativnih CI/CII stanica svrstan je u skupinu karakteristično velikih brzina, za razliku od vegetativnih stanica divljeg tipa, a niti jedna agregacijski kompetentna stanica CI/CII nije svrstana u skupinu stanica s jakim signalom na niskim frekvencijama, što ju razlikuje od ostalih promatranih populacija. Netipično brze vegetativne CI/CII stanice i gubitak signala na niskim frekvencijama agregacijski kompetentnih CII stanica odgovaraju smanjenoj inhibiciji lateralnih pseudopodija korteksilinskog mutanta.

S obzirom na primijećenu heterogenost u načinu gibanja stanica pojedinih populacija, odlučili smo za svaku podskupinu stanica identificiranu unutar pojedine biološke populacije odrediti parametre Langevinovog modela proširenog memorijskim članom. Isprobali smo nekoliko različitih oblika proširenog Langevinovog modela te ustanovili da, u postavljenim uvjetima optimizacije, promatrane stanice najbolje opisuje model čiji je član koji opisuje kočenje, $\beta(v)$, opisan polinomom prvog stupnja, a paralelna i okomita komponenta šuma, $\sigma(v)$, opisane polinomima drugog stupnja. Trajektorije simulirane navedenim modelom dobro oponašaju karakteristike trajektorija promatranih stanica, kao što su distribucija brzine, periodogram vektora brzine i ovisnosti srednje vrijednosti i standardne devijacije paralelne i okomite komponente akceleracije o brzini. Ovaj poopćeni Langevinov model sadrži 11 slobodnih parametara, koji u složenoj interakciji fenomenološki opisuju gibanje stanica. Usporedbom vrijednosti parametara identificiranih podskupina stanica, uočena je veća sličnost stanica koje pripadaju istoj skupini dobivenoj nenadziranom klasifikacijom, od sličnosti stanica iste biološke populacije. Ovime je potvrđena potreba za razvrstavanjem stanica heterogene biološke populacije u subpopulacije stanica sličnog načina gibanja.

8. Summary

Cell motility is of crucial importance for many physiological and pathological processes in multicellular organisms. The amoeboid protozoan *Dictyostelium discoideum* is a standard model organism used in cell motility research as well-suited for studying components of the actin cytoskeleton that are functionally conserved throughout the eukaryotic domain. Initial research of cell motility was based on the Brownian motion model describing random movement of small particles caused by thermic fluctuations. Over time, more precise measurements revealed intrinsic patterns in locomotion paths of eukaryotic cells, leading to modifications and extensions of the aforementioned model. The aim of this research was to characterize cell motility of cortexillins mutants of *D. discoideum* within the framework of a generalized Langevin model extended with a memory term and compare it to the characteristics of the wild type strain. We also aimed to investigate the heterogeneity of motile behavior within the population of cells with the same genetic background at the specific stage of the life cycle.

We monitored the motile behavior of cells from two different strains of *D. discoideum*, an axenic wild-type strain (AX2) and a strain lacking cortexillins (CI/CII), in two different stages of their life cycle – vegetative and aggregation-competent. Cortexillins are actin-bundling proteins that have an important role in stabilizing the cell shape, in cell motility and cell division. Recent findings suggest that cortexillins also play an important role in signal transduction leading to the inhibition of actin polymerization and pseudopod formation.

Non-stimulated migration of *D. discoideum* cell was monitored by dark-field microscopy at low magnification. From the acquired cell trajectories we calculated instantaneous cell velocity and mean-square displacement for each monitored population. We found that CI/CII cells move significantly faster in both stages of their life cycle. Considering that the migration was measured with the time resolution of 0.5 s^{-1} , the measured instantaneous velocity is influenced not only by cell's translocation, but also by the dynamic of pseudopod extension. The increase in speed of cortexillin mutants is probably caused by an increased number of lateral pseudopods. This conclusion is supported by the observation that the population of migrating aggregation-competent CI/CII cells covers less total area than wild-type population, despite of the increased instantaneous speed of individual cells.

In order to investigate heterogeneity within observed cell populations, we extracted 14 parameters that quantitatively describe individual cell's locomotion based on its speed

distribution, speed and velocity autocorrelation, and the periodogram of speed and velocity. Cluster analysis has determined three different clusters among all observed cells – a cluster of fast-moving cells, a cluster of slow-moving cells, and a cluster of cells with high power in the low-frequency region of the velocity periodogram. It has been determined that the two most discriminative features that characterize the identified clusters are the average cell speed and the total power of the velocity periodogram at low frequencies. We further investigated the distribution of cells belonging to different biological populations of *D. discoideum* among these cluster. While no vegetative AX2 cells belong to the cluster characterized by high speed, a set of vegetative CI/CII cells belong to this cluster. Furthermore, unlike cells belonging to other biological populations, none of the aggregation-competent CI/CII cells had a strong signal in the low- frequency region of the velocity periodogram. Our findings indicate differences between AX2 and CI-/CII- strains both in their vegetative and in their aggregation-competent state which can be explained by the loss of inhibition of lateral pseudopods in cells lacking both cortexillins. 8

Because of the observed heterogeneity within cell populations, each identified subpopulation within each strain at a given developmental stage was fitted to the generalized Langevin equation extended with a memory term. By fitting experimental data to several different forms of the generalized Langevin model, we found that, in our optimization framework, the observed trajectories are best described with the model whose velocity decay rate, $\beta(v)$, is described by the polynomial of the first degree, and the noise strength, $\sigma(v)$, by the polynomial of the second-degree. Trajectories simulated by the described model show similar speed distribution, velocity periodogram and dependence of the mean and standard deviation of parallel and orthogonal acceleration's component on instantaneous speed to the trajectories of the observed *Dictyostelium* cells. The 11 parameters of the generalized Langevin model describe the observed cell migration in a complex, cooperative manner. The comparison between the model parameters among the ten identified subpopulations showed a larger mutual similarity of cells belonging to the same cluster than of the cells belonging to the same biological population. This finding justified the initial classification of biological populations into subpopulations of cells with similar motile characteristics.

9. Popis kratica

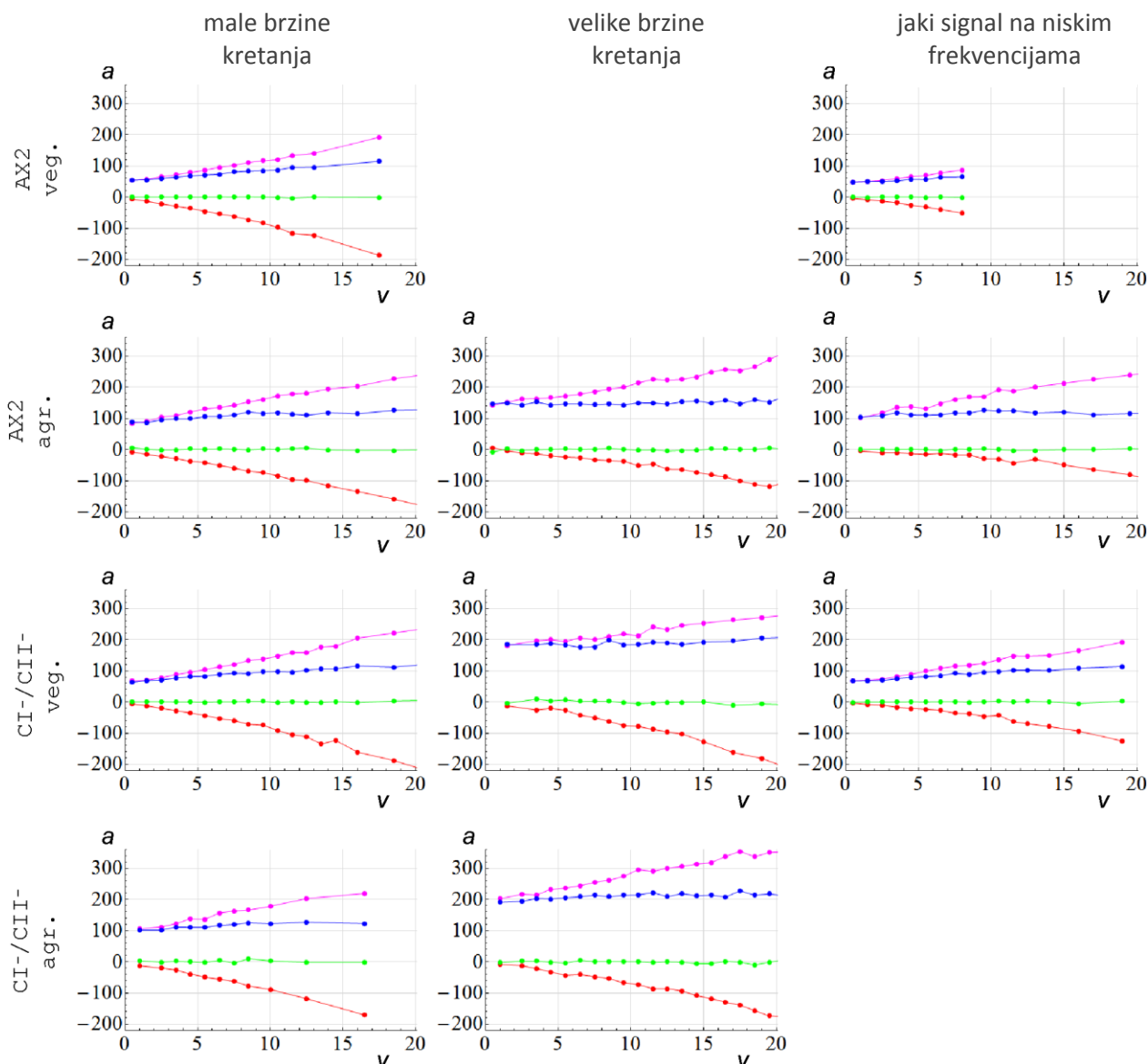
ABP-120	engl. <i>actin-binding protein 120</i>
ACA	engl. <i>adenylate cyclase of aggregation stage</i>
ADP	engl. <i>adenosine diphosphate</i>
agr.	agregacijski kompetentne stanice
Arp2/3	engl. <i>actin related proteins 2/3</i>
ATP	engl. <i>adenosine triphosphate</i>
avrg_speed	engl. <i>average speed</i>
AX	engl. <i>axenic</i>
cAMP	engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cAR1	engl. <i>cAMP receptor 1</i>
CR	engl. <i>crossover constant</i>
CCD	engl. <i>charge-coupled device</i>
ctx	engl. <i>cortexillin gene</i>
CI	engl. <i>cortexillin I</i>
CII	engl. <i>cortexillin II</i>
DEA	engl. <i>differential evolution algorithm</i>
DMSO	engl. <i>dimethyl sulfoxide</i>
F _{AP}	RMSD između vrijednosti paralelne komponente akceleracije eksperimentalno dobivenog i simuliranog skupa trajektorija
F _S	RMSD između vrijednosti rapodjele brzine eksperimentalno dobivenog i simuliranog skupa trajektorija
F _{SAO}	RMSD između vrijednosti standardne devijacije okomite komponente akceleracije eksperimentalno dobivenog i simuliranog skupa trajektorija
F _{SAP}	RMSD između vrijednosti standardne devijacije paralelne komponente akceleracije eksperimentalno dobivenog i simuliranog skupa trajektorija
F	vrijednost ciljne funkcije; mjera različitosti dviju populacija
F-actin	engl. <i>filamentous actin</i>
G-actin	engl. <i>globular actin</i>
GAPA	engl. <i>RasGTPase activating protein</i>
GTP	engl. <i>guanosine triphosphate</i>
high_Pspeed	engl. <i>total amount of speed periodogram intensities on high frequencies</i>
high_Pvel	engl. <i>total amount of velocity periodogram intensities on high frequencies</i>

IQGAP	engl. <i>IQ motif containing GTPase activating protein</i>
IQR	engl. <i>interquartile range</i>
kurt_speed	engl. <i>kurtosis of speed distribution</i>
low_Pspeed	engl. <i>total amount of speed periodogram intensities on low frequencies</i>
low_Pvel	engl. <i>total amount of velocity periodogram intensities on low frequencies</i>
M	konstanta mutacije u DEA-u
MB	engl. <i>millions of base pairs</i>
mid_Pspeed	engl. <i>total amount of speed periodogram intensities on medium frequencies</i>
mid_Pvel	engl. <i>total amount of velocity periodogram intensities on medium frequencies</i>
myoII	engl. <i>myosin II</i>
NA	engl. <i>numerical aperture</i>
NP	engl. <i>number of population vectors</i>
PIP ₂	engl. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP ₃	engl. <i>phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>
PI3K	engl. <i>phosphatidylinositide 3-kinase</i>
Rac	engl. <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rho	engl. <i>Ras homologous</i>
Ras	engl. <i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RMSD	engl. <i>root-mean-square deviation</i>
rnd_ACspeed	engl. <i>lag value of first randomization of speed autocorrelogram</i>
rnd_ACvel	engl. <i>lag value of first randomization of velocity autocorrelogram</i>
Scar	engl. <i>suppressor of cAMP receptor</i>
skew_speed	engl. <i>skewness of speed distribution</i>
stdev_speed	engl. <i>standard deviation of speed distribution</i>
OU proces	Ornstein-Uhlenbeckov proces
var_ACspeed	engl. <i>variance of speed autocorrelogram</i>
var_ACvel	engl. <i>variance of velocity autocorrelogram</i>
veg.	vegetativne stanice
WASP	engl. <i>Wiskott-Aldrich syndrome family protein</i>

10. Prilozi

10.1. Ovisnost akceleracije o brzini u pojedinim podskupinama stanica

Ovisnost paralelne i okomite komponente akceleracije, odnosno njihovih srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, o brzini (slika 10.1.) korištena je za usporedbu eksperimentalnih i simuliranih trajektorija u procesu traženja parametara Langevinovog modela za podskupine stanica.



Slika 10.1. Ovisnost akceleracije (a , $\mu\text{m}/\text{min}^2$) o brzini (v , $\mu\text{m}/\text{min}$) u deset identificiranih podskupina: ovisnost srednje vrijednosti (crvena linija) i standardne devijacije (ljubičasta linija) paralelne komponente akceleracije o brzini, te ovisnost srednje vrijednosti (zelena linija) i standardne devijacije (plava linija) okomite komponente akceleracije o brzini.

10.2. Simulacija trajektorija u programskom paketu Mathematica

Simulacija trajektorija razvijena u programskom paketu *Mathematica* izvedena je rješavanjem sustava dviju diferencijalnih jednačini

$$\frac{d\vec{v}(t)}{dt} = -\beta(v(t))\vec{v}(t) - \alpha\vec{V}(t) + \sigma(v(t))\vec{\eta}(t)$$

$$\frac{d\vec{V}(t)}{dt} = \alpha\vec{v}(t) - \gamma\vec{V}(t),$$

s time da je $\vec{V}(t)$ je memorija brzine definirana s

$$\vec{V}(t) = \alpha \int_{-\infty}^t \vec{v}(\tau) e^{-\gamma(t-\tau)} d\tau ,$$

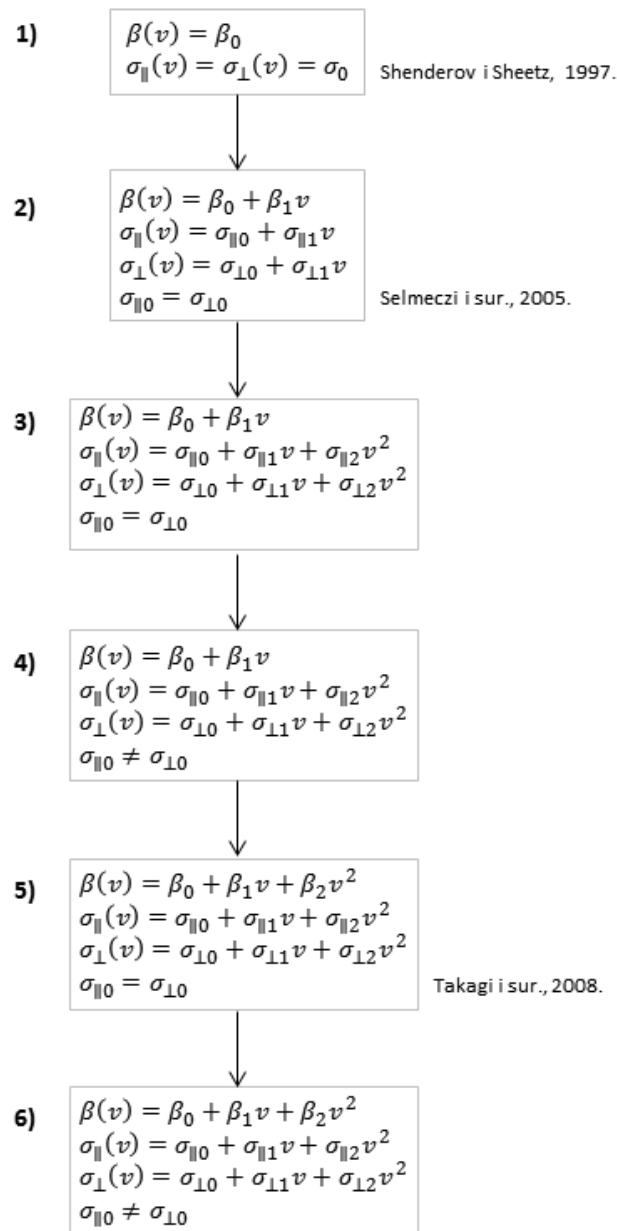
a $\vec{\eta}(t)$ je dobiven polinomijalnom interpolacijom liste nasumično generiranih vektora s uniformno distribuiranim smjerom i normalno distribuiranom amplitudom. Parametri $\alpha, \gamma, \beta(v)$ i $\vec{\sigma}(\vec{v})$ definirani su na isti način kao i u poglavlju 2.6.1. („Materijali i metode“).

10.3. Parametri različitih oblika proširenog Langevinovog modela

Rezultati prikazani u tablicama 10.1. do 10.4. dobiveni su procjenama parametara proširenih Langevinovih modela gibanja različitih razina složenosti, ovisno o tome kako su definirani funkcionalni oblici $\beta(v)$ i $\sigma(v)$. Osnovni oblik proširenog Langevinovog modela je

$$\frac{d\vec{v}(t)}{dt} = -\beta(v(t)) \cdot \vec{v}(t) + \alpha^2 \int_{-\infty}^t \vec{v}(\tau) \cdot e^{-\gamma(t-\tau)} d\tau + \sigma(\vec{v}(t)) \cdot \vec{\eta}(t) ,$$

a definicija parametara $\beta(v)$ i $\sigma(v)$ prikazana je prema složenosti, hijerarhijskom shemom u slici 10.2.



Slika 10.2. Različite definicija parametara $\beta(v)$ i $\sigma(v)$ prikazana shematski prema složenosti. Redni broj definicije u shemi odgovara rednom broju rezultata u tablicama 10.1. do 10.4. Pored pojedinih definicija naveden je odgovarajući literaturni navod.

Radi usporedbe, u tablici su ponovljeni rezultati modela koji najbolje opisuje eksperimentalno promatrane populacije (prethodno navedeni u tablicama 3.3. do 3.5. poglavlja „Rezultati“). Spomenuti rezultati navedeni su pod rednim brojem 4.

		$F(x_{i,G})$	α	γ	β_0	$\beta_1 \cdot 10^6$	$\beta_2 \cdot 10^9$	$\sigma_{p0} \cdot 10^{-9}$	σ_{p1}	$\sigma_{p2} \cdot 10^6$	$\sigma_{o0} \cdot 10^{-9}$	σ_{o1}	$\sigma_{o2} \cdot 10^6$
male brzine	1)	0.33	0.283	0.893	0.171			18.8			18.8		
	2)	0.22	0.159	0.277	0.053	1.178		20.3	0.037		20.3	-0.536	
	3)	0.26	0.225	2.278	0.202	-1.289		14.4	0.197	-1.691	14.4	0.303	-1.615
	4)	0.11	0.079	0.037	0.177	0.734		29.1	0.380	-2.405	59.4	-1.362	7.191
	5)	0.22	0.163	3.230	-0.189	1.614	11360	-2.0	0.508	-0.622	-2.0	0.437	-1.299
	6)	0.22	0.070	1.039	-0.003	0.476	1554	16.7	0.184	-1.080	-22.2	0.352	-1.491
signal na niskim frekvencijama	1)	0.40	0.142	0.593	0.068			11.1			11.1		
	2)	0.24	0.197	2.075	-0.105	1.459		8.7	0.086		8.7	-0.287	
	3)	0.25	0.378	0.509	0.136	2.197		13.3	0.185	-0.470	13.3	-0.441	0.252
	4)	0.09	0.183	0.074	0.434	0.762		24.6	0.680	-3.808	64.3	-0.932	1.248
	5)	0.16	0.149	0.065	0.321	0.798	1237	15.0	0.408	-1.871	15.0	0.450	-1.613
	6)	0.16	0.116	0.057	0.194	0.795	2310	8.2	0.550	-2.606	23.0	0.024	0.844

Tablica 10.1. Vrijednosti parametara Langevinovog modela definiranog različitim funkcionalnim oblicima $\beta(v)$ i $\sigma(v)$, za podskupine **vegetativnih AX2 stanica** protista *D. discoideum*.

		$F(x_{i,G})$	α	γ	β_0	$\beta_1 \cdot 10^6$	$\beta_2 \cdot 10^9$	$\sigma_{p0} \cdot 10^{-9}$	σ_{p1}	$\sigma_{p2} \cdot 10^6$	$\sigma_{o0} \cdot 10^{-9}$	σ_{o1}	$\sigma_{o2} \cdot 10^6$
male brzine	1)	0.43	0.412	0.797	0.342			41.7			41.7		
	2)	0.13	0.074	0.027	0.220	0.369		46.7	0.355		46.7	0.108	
	3)	0.10	0.077	0.030	0.192	0.458		35.4	0.407	0.101	35.4	0.362	-0.806
	4)	0.10	0.076	0.030	0.192	0.412		35.6	0.381	0.168	37.2	0.316	-0.686
	5)	0.11	0.076	0.029	0.256	0.146	182	42.3	0.342	0.172	42.3	0.284	-0.683
	6)	0.07	0.073	0.030	0.169	0.334	158	64.1	0.126	0.512	66.1	-0.496	0.081
velike brzine	1)	0.19	0.056	0.021	0.207			99.3			99.3		
	2)	0.06	0.068	0.025	0.148	0.239		-74.5	-0.308		-74.5	-0.020	
	3)	0.05	0.066	0.024	0.214	0.052		74.6	0.277	0.026	74.6	0.088	-0.238
	4)	0.05	0.068	0.025	0.172	0.159		69.4	0.311	0.012	71.6	0.119	-0.361
	5)	0.05	0.064	0.024	0.260	-0.304	335	76.3	0.199	0.187	76.3	0.074	-0.310
	6)	0.05	0.075	0.028	0.176	0.107	200	60.6	0.409	-0.099	71.7	0.180	-0.564
signal na niskim frekvencijama	1)	0.26	0.066	0.033	0.170			72.7			72.7		
	2)	0.06	0.085	0.037	0.207	0.067		53.3	0.285		53.3	0.040	
	3)	0.06	0.093	0.039	0.233	0.064		53.9	0.325	-0.083	53.9	0.078	-0.108
	4)	0.06	0.095	0.042	0.202	0.136		46.1	0.370	-0.112	53.5	0.058	-0.045
	5)	0.07	0.100	0.044	0.280	-0.380	710	55.2	0.263	0.142	55.2	0.033	0.023
	6)	0.07	0.093	0.043	0.141	0.214	128	38.9	0.405	-0.072	48.8	0.047	-0.012

Tablica 10.2. Vrijednosti parametara Langevinovog modela definiranog različitim funkcionalnim oblicima $\beta(v)$ i $\sigma(v)$, za podskupine **agregacijski kompetentnih AX2 stanica** protista *D. discoideum*.

		$F(x_{i,G})$	α	γ	β_0	$\beta_1 \cdot 10^6$	$\beta_2 \cdot 10^9$	$\sigma_{p0} \cdot 10^{-9}$	σ_{p1}	$\sigma_{p2} \cdot 10^6$	$\sigma_{o0} \cdot 10^{-9}$	σ_{o1}	$\sigma_{o2} \cdot 10^6$
male brzine	1)	0.42	0.366	1.071	0.209			22.4			22.4		
	2)	0.27	0.359	3.297	-0.134	1.807		-0.8	0.402		-0.8	0.313	
	3)	0.14	0.080	0.031	0.068	1.777		24.5	0.439	-1.306	24.5	0.114	0.572
	4)	0.08	0.061	0.027	0.079	0.743		16.9	0.310	0.505	21.0	0.222	-0.097
	5)	0.15	0.058	0.024	0.069	0.838	1876	34.6	0.259	-1.102	34.6	-0.418	2.406
	6)	0.08	0.073	0.032	0.054	0.924	101	16.5	0.445	0.327	29.3	0.070	0.215
velike brzine	1)	0.16	0.099	0.038	0.381			134.6			134.6		
	2)	0.10	0.103	0.036	0.082	0.927		95.4	0.357		95.4	0.105	
	3)	0.10	0.086	0.034	0.170	0.400		69.1	0.249	0.280	69.1	0.336	-0.341
	4)	0.07	0.097	0.032	0.084	0.875		120.6	0.151	0.237	-194.4	1.061	-0.375
	5)	0.08	0.112	0.040	-0.048	1.473	-368	77.1	0.377	0.317	77.1	0.332	-0.316
	6)	0.08	0.099	0.036	0.140	0.588	83	89.1	0.242	0.376	94.1	0.191	-0.312
signal na niskim frekvencijama	1)	0.44	0.136	0.453	0.076			18.2			18.2		
	2)	0.07	0.127	0.057	0.307	0.166		36.3	0.296		36.3	0.118	
	3)	0.07	0.111	0.052	0.225	0.297		27.1	0.296	0.087	27.1	0.221	-0.268
	4)	0.07	0.118	0.056	0.202	0.477		18.3	0.419	-0.094	26.8	0.250	-0.354
	5)	0.06	0.134	0.060	0.329	0.101	39	29.4	0.299	0.078	29.4	0.298	-0.602
	6)	0.08	0.096	0.050	0.105	0.606	33	15.7	0.393	-0.015	23.6	0.173	-0.079

Tablica 10.3. Vrijednosti parametara Langevinovog modela definiranog različitim funkcionalnim oblicima $\beta(v)$ i $\sigma(v)$, za podskupine **vegetativnih CI/CII stanica** protista *D. discoideum*.

		$F(x_{i,G})$	α	γ	β_0	$\beta_1 \cdot 10^6$	$\beta_2 \cdot 10^9$	$\sigma_{p0} \cdot 10^{-9}$	σ_{p1}	$\sigma_{p2} \cdot 10^6$	$\sigma_{o0} \cdot 10^{-9}$	σ_{o1}	$\sigma_{o2} \cdot 10^6$
male brzine	1)	0.45	0.096	0.076	0.273			45.2			45.2		
	2)	0.10	0.084	0.023	0.298	0.452		55.0	0.451		55.0	0.088	
	3)	0.08	0.087	0.024	0.322	0.400		49.5	0.461	0.061	49.5	0.283	-0.721
	4)	0.08	0.083	0.025	0.102	1.053		28.5	0.565	0.235	42.1	0.296	-0.658
	5)	0.09	0.108	0.038	0.062	0.797	0	141.4	0.414	-0.039	141.4	-0.360	-0.418
	6)	0.08	0.086	0.025	0.292	-0.267	1905	37.7	0.515	0.217	-57.5	-0.065	-0.041
velike brzine	1)	0.21	0.043	0.017	0.208			119.8			119.8		
	2)	0.09	0.082	0.027	0.349	0.020		153.6	0.305		153.6	-0.301	
	3)	0.07	0.088	0.032	0.152	0.389		116.9	0.383	0.049	116.9	0.016	-0.394
	4)	0.05	0.080	0.026	0.062	0.589		120.5	0.412	-0.006	143.7	-0.397	-0.202
	5)	0.06	0.108	0.038	0.062	0.797	0	141.4	0.414	-0.039	141.4	-0.360	-0.418
	6)	0.06	0.084	0.028	0.170	0.162	349	134.6	0.272	0.190	155.5	-0.586	-0.064

Tablica 10.4. Vrijednosti parametara Langevinovog modela definiranog različitim funkcionalnim oblicima $\beta(v)$ i $\sigma(v)$, za podskupine **agregacijski kompetentnih CI/CII stanica** protista *D. discoideum*.

10.4. Uspješnost procjene parametara pojedinih podskupina stanica

U slikama 10.3. do 10.12. prikazane su vrijednosti raspodjele trenutne brzine, ovisnosti akceleracije o brzini te periodogrami vektora brzine za populacije trajektorija simuliranih poopcenim Langevinovim modelom, koristeći parametre navedene u poglavlju 3.4. („Rezultati“). Na svakoj se slici, uz navedene karakteristike simulirane populacije (gornja tablica), za usporedbu nalazi referentna biološka populacija (donja tablica) te su navedene vrijednosti pojedinih i ukupne ciljne funkcije. Veličina obojenog stupca odgovara brojčanoj vrijednosti prikazanoj u tablici. Plavom bojom označene su vrijednosti distribucije brzine, s time da svaka vrijednost odgovara broju pojavljivanja brzine unutar raspona vrijednosti opisanih u poglavlju 2.6.2.1. („Materijali i metode“). Srednje vrijednosti i standardne devijacije paralelne i okomite komponente akceleracije ovisne o brzini označene su crvenom bojom, a svaka navedena vrijednost redom odgovara vrijednosti brzine opisanoj u poglavlju 2.6.2.2. Zelenom bojom označene su vrijednosti periodograma, redom na frekvencijama navedenim u poglavlju 2.6.2.3. Vrijednosti pojedinih ciljnih funkcija i ukupne ciljne funkcije označene su ljubičastom bojom.

Raspodjela brzine	Srednja vrijednost paralelene komp. akceleracije	Standardna devijacija paralelene komp. akceleracije	Srednja vrijednost okomite komp. akceleracije	Standardna devijacija okomite komp. akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
4013	-1.117E-09	0.000000016	5.513E-10	1.535E-08	0.01117	F _S	0.1137
9734	-2.002E-09	1.662E-08	-7.363E-11	1.415E-08	0.02137		0.07232
9597	-3.856E-09	1.763E-08	-1.878E-10	1.231E-08	0.03498	F _{AP}	
7698	-5.695E-09	1.844E-08	1.657E-10	9.865E-09	0.08455		0.1108
5831	-7.452E-09	1.877E-08	6.811E-11	7.465E-09	0.1334	F _{SAP}	
4399	-9.722E-09	1.869E-08	-7.466E-11	6.288E-09	0.182		0.3436
3182	-1.189E-08	1.812E-08	1.322E-10	5.222E-09	0.2381	F _{SAO}	
2049	-1.478E-08	1.751E-08	-1.026E-10	5.729E-09	0.3185		0.3714
1009	-1.643E-08	1.584E-08	-2.773E-10	7.636E-09	0.3707	F _p	
367	-1.834E-08	1.294E-08	-3.939E-10	1.086E-08	0.4155		0.05999
41	-2.088E-08	1.358E-08	-1.463E-10	1.265E-08	0.5491		
0					0.6002		
0					0.9678		
0					1.019		
0							
0							
0							
0							
0							
0							
0							
12210	-1.911E-09	1.485E-08	1.634E-10	1.491E-08	0.007539		
27100	-3.913E-09	1.598E-08	-6.146E-11	1.532E-08	0.02607		
28090	-6.109E-09	1.792E-08	-1.156E-11	1.661E-08	0.06003		
22660	-8.163E-09	1.998E-08	-2.896E-11	1.766E-08	0.1024		
16860	-1.017E-08	2.177E-08	1.172E-10	1.877E-08	0.1657		
11690	-1.279E-08	2.39E-08	6.511E-11	1.974E-08	0.2217		
8052	-1.503E-08	2.642E-08	-9.98E-11	2.03E-08	0.2775		
5383	-1.717E-08	2.84E-08	-5.01E-11	2.232E-08	0.3025		
3568	-2.041E-08	3.075E-08	-1.628E-10	2.303E-08	0.3999		
2234	-2.319E-08	3.234E-08	3.713E-11	2.349E-08	0.4003		
1529	-2.71E-08	3.32E-08	3.973E-10	2.393E-08	0.4836		
1025	-3.253E-08	3.706E-08	1.269E-09	2.636E-08	0.6137		
660	-3.317E-08	3.741E-08	1.689E-10	2.758E-08	0.95		
439	-3.548E-08	4.101E-08	1.138E-10	2.492E-08	1.024		
347	-4.628E-08	4.818E-08	-4.511E-10	3.339E-08			
223	-4.757E-08	4.643E-08	1.661E-09	2.835E-08			
145	-4.958E-08	4.988E-08	1.09E-09	2.993E-08			
128	-4.845E-08	5.425E-08	1.103E-09	2.963E-08			
78	-6.475E-08	6.104E-08	-8.91E-10	4.424E-08			
55	-7.98E-08	6.778E-08	-2.262E-09	2.757E-08			

Slika 10.3. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **sporih vegetativnih AX2 stanica**. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine		Srednja vrijednost paralelene akceleracije	Standardna devijacija paralelene akceleracije	Srednja vrijednost okomite akceleracije	Standardna devijacija okomite akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
2050		-1.977E-09	2.368E-08	-6.98E-10	2.385E-08	0.01064	F _S	0.1022
4869		-2.17E-09	2.519E-08	-2.819E-11	2.491E-08	0.01763		0.02013
5782		-3.625E-09	2.692E-08	2.869E-10	2.622E-08	0.03022	F _{AP}	
5763		-4.939E-09	2.96E-08	2.104E-11	2.777E-08	0.0565		0.07505
5223		-7.222E-09	3.128E-08	-1.312E-10	2.82E-08	0.07921	F _{SAP}	
4433		-9.326E-09	3.447E-08	5.737E-10	2.924E-08	0.1102		0.1005
3718		-1.194E-08	3.664E-08	5.055E-10	3.045E-08	0.1534	F _{SAO}	
3106		-1.336E-08	3.915E-08	1.639E-11	3.082E-08	0.1825		0.0531
2515		-1.671E-08	4.035E-08	-3.863E-10	3.215E-08	0.1422	F _p	
1970		-1.749E-08	4.441E-08	9.354E-10	3.188E-08	0.2877		0.2212
1577		-2.313E-08	4.742E-08	1.455E-10	3.181E-08	0.4141		
1279		-2.645E-08	4.764E-08	1.198E-09	3.193E-08	0.4057		
1038		-2.789E-08	5.08E-08	-1.02E-09	3.132E-08	0.485		
821		-2.754E-08	5.634E-08	3.979E-10	3.166E-08	0.7323		
655		-3.579E-08	5.428E-08	-7.202E-10	3.086E-08			
523		-3.38E-08	5.647E-08	4.682E-13	3.082E-08			
446		-3.567E-08	5.951E-08	1.146E-09	3.432E-08			
346		-4.633E-08	6.638E-08	-5.527E-10	2.993E-08			
330		-4.355E-08	6.972E-08	6.97E-10	3.349E-08			
224		-4.713E-08	6.806E-08	-1.496E-09	3.173E-08			
2176		-2.478E-09	2.325E-08	-1.617E-09	2.45E-08	0.009246		
5346		-4.373E-09	2.497E-08	-1.789E-10	2.392E-08	0.02881		
6396		-6.223E-09	2.885E-08	5.252E-10	2.636E-08	0.06119		
6408		-8.085E-09	3.026E-08	3.353E-10	2.736E-08	0.07367		
5624		-1.055E-08	3.322E-08	-4.134E-10	2.731E-08	0.09338		
4733		-1.177E-08	3.629E-08	-2.032E-10	2.931E-08	0.1306		
4125		-1.42E-08	3.743E-08	-4.81E-10	2.941E-08	0.1484		
3445		-1.657E-08	3.938E-08	-3.523E-10	3.073E-08	0.1664		
2721		-1.954E-08	4.237E-08	4.345E-10	3.341E-08	0.1516		
2270		-2.071E-08	4.455E-08	-4.715E-10	3.201E-08	0.2016		
1773		-2.345E-08	4.781E-08	-4.098E-11	3.279E-08	0.3246		
1382		-2.697E-08	4.953E-08	-8.215E-10	3.153E-08	0.4723		
1131		-2.761E-08	5.008E-08	-1.255E-09	3.041E-08	0.6681		
936		-3.024E-08	5.381E-08	7.667E-10	3.367E-08	0.6362		
796		-3.506E-08	5.4E-08	3.551E-10	3.163E-08			
647		-3.653E-08	5.647E-08	9.777E-10	3.031E-08			
539		-3.878E-08	5.611E-08	1.134E-09	3.328E-08			
376		-4.433E-08	6.238E-08	1.335E-09	3.303E-08			
337		-4.101E-08	6.495E-08	1.802E-09	3.628E-08			
298		-4.758E-08	6.079E-08	-5.887E-10	3.545E-08			

Slika 10.4. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **sporih agregacijski kompetentnih AX2 stanica**. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine	Srednja vrijednost paralelene akceleracije	Standardna devijacija paralelene akceleracije	Srednja vrijednost okomite akceleracije	Standardna devijacija okomite akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
3066	-2.349E-10	1.365E-08	8.919E-11	1.38E-08	0.01097	F _S	0.08191
7039	-9.038E-10	1.477E-08	1.04E-10	1.507E-08	0.02131		0.01833
7735	-1.701E-09	1.697E-08	1.46E-10	1.663E-08	0.04125	F _{AP}	
7037	-2.559E-09	1.946E-08	-2.575E-11	1.813E-08	0.08155		0.2169
5633	-4.277E-09	2.202E-08	-8.192E-11	2.009E-08	0.1109	F _{SAP}	
4475	-5.498E-09	2.471E-08	1.595E-10	2.133E-08	0.1523		0.1534
3237	-8.873E-09	2.647E-08	5.954E-10	2.19E-08	0.2284	F _{SAO}	
2340	-8.542E-09	3.145E-08	-8.722E-11	2.409E-08	0.2468		0.1183
1833	-1.377E-08	3.194E-08	4.04E-10	2.449E-08	0.2245	F _p	
1333	-1.643E-08	3.385E-08	-1.039E-09	2.508E-08	0.4153		0.09538
945	-1.786E-08	3.857E-08	1.521E-09	2.807E-08	0.6216		
760	-2.02E-08	4.07E-08	-2.023E-09	2.839E-08	0.5708		
564	-2.548E-08	4.199E-08	1.557E-09	3.086E-08	0.8094		
394	-2.735E-08	4.493E-08	2.221E-09	3.048E-08	1.39		
322	-2.804E-08	4.831E-08	-2.032E-09	3.627E-08			
240	-3.745E-08	5.696E-08	-2.014E-09	3.292E-08			
207	-3.82E-08	5.855E-08	-6.536E-10	3.018E-08			
149	-4.38E-08	5.659E-08	-2.457E-09	3.193E-08			
98	-5.297E-08	5.101E-08	1.268E-09	3.561E-08			
111	-5.13E-08	7.312E-08	7.533E-10	3.494E-08			
11170	-1.799E-09	1.859E-08	6.991E-11	1.758E-08	0.0139		
26390	-3.515E-09	1.944E-08	-1.092E-10	1.903E-08	0.0278		
29330	-5.758E-09	2.155E-08	-1.429E-10	1.97E-08	0.0521		
25940	-7.759E-09	2.421E-08	1.427E-10	2.12E-08	0.07866		
20850	-9.807E-09	2.637E-08	1.26E-10	2.25E-08	0.1182		
16090	-1.221E-08	2.885E-08	4.732E-10	2.284E-08	0.1632		
12180	-1.479E-08	3.11E-08	5.604E-11	2.438E-08	0.2212		
9091	-1.66E-08	3.341E-08	-7.686E-11	2.553E-08	0.2839		
6827	-1.996E-08	3.698E-08	-4.268E-10	2.525E-08	0.3324		
5190	-2.086E-08	3.813E-08	-5.537E-10	2.672E-08	0.4137		
3702	-2.536E-08	4.068E-08	8.684E-10	2.708E-08	0.5574		
2890	-2.923E-08	4.385E-08	-2.813E-10	2.661E-08	0.5916		
2090	-3.115E-08	4.383E-08	3.421E-10	2.829E-08	0.9218		
1613	-3.745E-08	4.877E-08	6.665E-10	2.949E-08	1.331		
1122	-3.439E-08	4.965E-08	-1.902E-10	2.953E-08			
929	-4.57E-08	5.701E-08	5.379E-10	3.098E-08			
721	-4.349E-08	5.661E-08	1.008E-09	3.325E-08			
544	-4.821E-08	5.778E-08	-2.506E-09	3.154E-08			
431	-5.416E-08	5.779E-08	6.472E-11	3.069E-08			
324	-5.66E-08	7.044E-08	7.284E-10	2.992E-08			

Slika 10.5. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **sporih vegetativnih CI/CII stanica**. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine	Srednja vrijednost paralelene komp. akceleracije	Standardna devijacija paralelene komp. akceleracije	Srednja vrijednost okomite komp. akceleracije	Standardna devijacija okomite komp. akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
1887	-1.221E-10	2.634E-08	-2.117E-11	2.554E-08	0.009746	F _S	0.07917
4792	-1.686E-09	2.856E-08	-1.96E-10	2.741E-08	0.01352		0.02584
6005	-2.975E-09	2.952E-08	2.908E-10	2.9E-08	0.01882	F _{AP}	
6003	-3.124E-09	3.281E-08	1.97E-10	2.989E-08	0.03463		0.1146
5289	-6.423E-09	3.495E-08	-1.431E-10	3.024E-08	0.04425	F _{SAP}	
4518	-8.825E-09	3.855E-08	-6.657E-11	3.207E-08	0.06943		0.09934
3682	-1.2E-08	4.098E-08	5.442E-10	3.2E-08	0.07948	F _{SAO}	
3019	-1.48E-08	4.324E-08	-1.6E-11	3.249E-08	0.1059		0.09106
2431	-1.81E-08	4.569E-08	1.153E-09	3.246E-08	0.08933	F _p	
1960	-2.216E-08	4.89E-08	1.515E-10	3.293E-08	0.176		0.123
1575	-2.642E-08	4.931E-08	-3.66E-10	3.276E-08	0.2635		
1246	-2.995E-08	5.667E-08	8.715E-10	3.283E-08	0.31		
979	-3.339E-08	5.607E-08	-1.339E-09	3.089E-08	0.4566		
830	-3.743E-08	5.702E-08	-1.536E-09	3.14E-08	0.8344		
637	-4.336E-08	5.73E-08	9.021E-10	3.025E-08			
550	-4.722E-08	6.16E-08	-1.401E-09	3.414E-08			
435	-5.797E-08	6.015E-08	1.399E-09	2.916E-08			
365	-5.574E-08	6.962E-08	-4.836E-10	3.226E-08			
278	-5.981E-08	7.077E-08	1.267E-09	3.499E-08			
252	-7.397E-08	6.678E-08	-8.407E-10	3.097E-08			
858	-2.864E-09	3.104E-08	-1.094E-09	2.789E-08	0.00673		
2048	-4.019E-09	2.858E-08	-8.292E-10	2.817E-08	0.01887		
2519	-5.672E-09	3.095E-08	4.319E-10	2.817E-08	0.04276		
2610	-7.479E-09	3.389E-08	-4.162E-10	3.089E-08	0.07245		
2270	-1.089E-08	3.834E-08	1.896E-10	3.06E-08	0.05594		
1859	-1.384E-08	3.783E-08	7.643E-10	3.055E-08	0.05945		
1554	-1.573E-08	4.342E-08	-1.251E-09	3.235E-08	0.05819		
1249	-1.745E-08	4.516E-08	1.291E-09	3.319E-08	0.1759		
1035	-2.178E-08	4.602E-08	-2.678E-09	3.46E-08	0.1028		
789	-2.272E-08	4.96E-08	-6.606E-10	3.194E-08	0.1426		
627	-2.721E-08	4.897E-08	-7.977E-10	3.6E-08	0.1992		
516	-3.165E-08	5.565E-08	1.465E-09	3.314E-08	0.3227		
399	-3.373E-08	5.881E-08	-2.059E-10	3.822E-08	0.5163		
346	-3.427E-08	5.42E-08	2.7E-10	3.454E-08	0.8106		
315	-3.919E-08	5.507E-08	1.383E-09	3.503E-08			
254	-4.829E-08	6.617E-08	-2.62E-09	2.995E-08			
190	-5.149E-08	5.119E-08	1.843E-09	3.189E-08			
149	-4.775E-08	6.221E-08	-2.161E-10	3.804E-08			
125	-6.079E-08	7.086E-08	5.014E-09	3.605E-08			
118	-7.679E-08	6.7E-08	2.147E-09	3.256E-08			

Slika 10.6. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **sporih agregacijski kompetentnih CI/CII stanica**. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine	Srednja vrijednost paralelene akceleracije	Standardna devijacija paralelene akceleracije	Srednja vrijednost okomite akceleracije	Standardna devijacija okomite akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
692	-9.339E-10	4.087E-08	-1.543E-09	3.962E-08	0.01042	F _S	0.04763
1804	-1.194E-09	4.168E-08	7.125E-10	4.006E-08	0.02019		0.01691
2519	-3.414E-09	4.265E-08	2.616E-10	3.962E-08	0.03386	F _{AP}	
3051	-1.648E-09	4.601E-08	5.944E-10	4.146E-08	0.06752		0.05053
3241	-2.8E-09	4.719E-08	1.534E-10	4.241E-08	0.09275	F _{SAP}	
3155	-5.729E-09	4.743E-08	-1.898E-09	4.172E-08	0.1258		0.06941
3192	-7.008E-09	4.9E-08	-1.55E-10	4.216E-08	0.1859	F _{SAO}	
2980	-9.21E-09	5.278E-08	-3.258E-10	4.266E-08	0.2247		0.08166
2741	-9.635E-09	5.331E-08	8.614E-10	4.196E-08	0.1928	F _p	
2597	-9.721E-09	5.613E-08	9.546E-10	4.161E-08	0.3428		0.06714
2321	-1.303E-08	5.964E-08	-1.346E-11	4.248E-08	0.5053		
2118	-1.569E-08	5.922E-08	1.279E-09	4.056E-08	0.6299		
1843	-1.641E-08	6.335E-08	-1.156E-09	4.204E-08	1.016		
1774	-1.743E-08	6.197E-08	-9.691E-11	4.102E-08	1.717		
1492	-1.748E-08	7.041E-08	4.166E-10	3.92E-08			
1388	-2.161E-08	6.606E-08	2.028E-09	3.958E-08			
1280	-2.215E-08	7.32E-08	-1.245E-09	3.875E-08			
1084	-2.339E-08	7.255E-08	5.141E-10	3.859E-08			
884	-2.865E-08	7.543E-08	9.012E-10	3.561E-08			
849	-3.044E-08	7.777E-08	-7.107E-10	3.682E-08			
1127	1.614E-09	3.927E-08	2.34E-09	4.065E-08	0.008523		
3264	-1.212E-09	4.214E-08	-5.113E-10	4.153E-08	0.03708		
4652	-3.352E-09	4.489E-08	9.188E-10	3.948E-08	0.08238		
5573	-3.868E-09	4.528E-08	2.284E-10	4.228E-08	0.1093		
6066	-5.782E-09	4.614E-08	-1.318E-10	3.955E-08	0.1538		
5798	-6.75E-09	4.762E-08	-5.937E-10	4.053E-08	0.1763		
5706	-7.32E-09	4.933E-08	-1.151E-10	4.058E-08	0.1944		
5418	-9.173E-09	5.134E-08	-3.339E-10	3.979E-08	0.2168		
4976	-9.865E-09	5.399E-08	-1.067E-09	4.045E-08	0.2713		
4620	-1.055E-08	5.546E-08	-1.179E-10	3.974E-08	0.3362		
4277	-1.446E-08	5.925E-08	7.976E-10	4.154E-08	0.4501		
3806	-1.291E-08	6.255E-08	4.815E-10	4.141E-08	0.6271		
3462	-1.769E-08	6.179E-08	1.472E-09	4.037E-08	1.056		
3215	-1.786E-08	6.239E-08	9.546E-10	4.232E-08	1.694		
2792	-2.04E-08	6.471E-08	8.48E-10	4.334E-08			
2497	-2.261E-08	6.893E-08	-4.506E-10	4.11E-08			
2273	-2.456E-08	7.139E-08	-4.296E-10	4.4E-08			
1954	-2.822E-08	7.032E-08	-1.278E-10	4.036E-08			
1796	-3.116E-08	7.349E-08	-1.592E-10	4.424E-08			
1603	-3.313E-08	8.006E-08	-1.247E-09	4.222E-08			

Slika 10.7. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **brzih agregacijski kompetentnih AX2 stanica**. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine		Srednja vrijednost paralelene akceleracije	Standardna devijacija paralelene akceleracije	Srednja vrijednost okomite akceleracije	Standardna devijacija okomite akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
	393	1.304E-09	5.468E-08	-1.354E-09	5.772E-08	0.01008	F _S	0.07243
	1133	-1.508E-09	5.645E-08	-1.565E-09	5.594E-08	0.01597		0.04216
	1839	-2.736E-09	5.524E-08	2.943E-10	5.572E-08	0.02288	F _{AP}	
	2394	-5.645E-09	5.538E-08	1.653E-09	5.446E-08	0.03926		0.05328
	2778	-5.871E-09	5.698E-08	1.225E-09	5.317E-08	0.06759	F _{SAP}	
	3121	-9.841E-09	5.656E-08	4.376E-10	5.224E-08	0.08078		0.1528
	3216	-9.92E-09	5.953E-08	6.616E-10	4.966E-08	0.115	F _{SAO}	
	3260	-1.17E-08	6.011E-08	-3.905E-10	4.973E-08	0.1225		0.1016
	3167	-1.271E-08	5.934E-08	-4.465E-10	4.759E-08	0.2068	F _p	
	2966	-1.715E-08	5.87E-08	1.882E-09	4.547E-08	0.2293		0.0865
	2689	-1.869E-08	6.154E-08	1.461E-11	4.534E-08	0.4629		
	2496	-1.98E-08	6.24E-08	-1.918E-09	4.503E-08	0.5898		
	2292	-2.625E-08	6.472E-08	-7.069E-10	4.446E-08	0.6467		
	2120	-2.813E-08	6.323E-08	1.602E-10	4.553E-08	0.8733		
	1900	-3.106E-08	6.48E-08	-4.535E-10	4.812E-08			
	1623	-3.535E-08	6.461E-08	-7.095E-10	4.915E-08			
	1528	-4.133E-08	6.621E-08	4.149E-10	5.159E-08			
	1225	-4.621E-08	6.242E-08	1.62E-09	5.134E-08			
	1117	-5.162E-08	6.591E-08	1.281E-09	5.479E-08			
	1038	-5.311E-08	6.601E-08	9.763E-10	5.893E-08			
	218	-7.078E-10	5.041E-08	6.618E-09	4.894E-08	0.01091		
	626	-1.816E-09	4.985E-08	4.665E-10	5.096E-08	0.02321		
	963	-5.389E-09	5.057E-08	5.331E-10	5.158E-08	0.03601		
	1226	-7.153E-09	5.448E-08	-2.506E-09	5.112E-08	0.05057		
	1488	-5.848E-09	5.544E-08	-9.918E-10	5.21E-08	0.09492		
	1487	-7.517E-09	5.394E-08	-1.784E-09	5.077E-08	0.127		
	1700	-1.201E-08	5.716E-08	-4.516E-10	4.852E-08	0.1252		
	1681	-1.401E-08	5.542E-08	-7.527E-10	4.911E-08	0.1154		
	1627	-1.737E-08	5.825E-08	-6.355E-10	5.498E-08	0.2322		
	1536	-2.112E-08	6.044E-08	8.082E-10	5.094E-08	0.1642		
	1489	-2.193E-08	5.887E-08	1.554E-09	5.104E-08	0.5209		
	1372	-2.452E-08	6.661E-08	1.025E-09	5.295E-08	0.5553		
	1255	-2.671E-08	6.437E-08	4.548E-10	5.267E-08	0.619		
	1084	-2.857E-08	6.81E-08	2.562E-10	5.116E-08	0.9001		
	980	-3.526E-08	6.915E-08	1.076E-09	5.337E-08			
	889	-3.57E-08	7.131E-08	-1.056E-09	5.317E-08			
	748	-4.547E-08	7.173E-08	2.898E-09	5.129E-08			
	726	-4.461E-08	7.411E-08	3.417E-09	5.698E-08			
	569	-4.711E-08	7.228E-08	1.708E-09	5.443E-08			
	473	-5.441E-08	7.83E-08	2.006E-09	5.949E-08			

Slika 10.8. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **brzih vegetativnih CI/CI'** stanica. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine	Srednja vrijednost paralelene komp. akceleracije	Standardna devijacija paralelene komp. akceleracije	Srednja vrijednost okomite komp. akceleracije	Standardna devijacija okomite komp. akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
484	-4.617E-09	6.524E-08	2.625E-09	5.995E-08	0.01097	F _S	0.05429
1344	-2.088E-09	6.361E-08	-2.651E-09	6.38E-08	0.019		0.01358
2080	-1.195E-09	6.737E-08	-1.757E-09	6.398E-08	0.02226	F _{AP}	
2528	-5.171E-09	6.825E-08	1.054E-09	6.217E-08	0.03685		0.05566
2766	-5.612E-09	7.008E-08	-1.73E-09	5.936E-08	0.0605	F _{SAP}	
2693	-6.683E-09	6.989E-08	-5.163E-10	5.86E-08	0.07615		0.03119
2757	-4.467E-09	7.534E-08	-5.953E-10	5.841E-08	0.096	F _{SAO}	
2610	-1.077E-08	7.659E-08	1.977E-10	5.713E-08	0.1231		0.1472
2629	-1.088E-08	7.85E-08	-7.125E-10	5.681E-08	0.1301	F _p	
2407	-1.542E-08	7.744E-08	-1.365E-09	5.5E-08	0.1838		0.06551
2258	-1.778E-08	8.439E-08	5.419E-11	5.2E-08	0.2824		
2007	-1.972E-08	8.292E-08	8.687E-11	5.044E-08	0.4167		
1916	-2.185E-08	8.375E-08	2.534E-09	5.007E-08	0.5107		
1671	-2.722E-08	8.742E-08	-2.422E-10	5.153E-08	0.5884		
1578	-2.977E-08	9.012E-08	1.722E-09	4.821E-08			
1495	-2.893E-08	9.238E-08	2.41E-09	4.934E-08			
1411	-3.503E-08	9.334E-08	-7.102E-10	4.931E-08			
1204	-3.561E-08	9.414E-08	-3.066E-10	4.954E-08			
1097	-4.275E-08	8.963E-08	-1.759E-09	4.583E-08			
1013	-4.516E-08	9.26E-08	-1.91E-09	4.782E-08			
982	-6.152E-10	5.202E-08	1.605E-11	5.315E-08	0.01082		
2850	-3.005E-09	5.744E-08	9.828E-10	5.277E-08	0.0335		
4069	-3.512E-09	6.013E-08	-5.226E-10	5.376E-08	0.05281		
5083	-6.203E-09	5.942E-08	-4.708E-10	5.635E-08	0.05093		
5475	-9.078E-09	6.454E-08	4.246E-10	5.598E-08	0.07232		
5376	-1.219E-08	6.56E-08	1.459E-09	5.69E-08	0.08974		
5509	-1.15E-08	6.781E-08	-1.253E-09	5.794E-08	0.1026		
5309	-1.339E-08	7.068E-08	-1.351E-10	5.917E-08	0.08606		
5162	-1.501E-08	7.263E-08	-1.587E-10	5.787E-08	0.1045		
4728	-1.894E-08	7.61E-08	-1.178E-10	5.913E-08	0.1868		
4512	-2.035E-08	8.206E-08	3.097E-11	5.953E-08	0.2715		
4098	-2.406E-08	8.039E-08	7.571E-10	6.158E-08	0.4288		
3782	-2.406E-08	8.337E-08	1.394E-10	5.789E-08	0.5048		
3457	-2.607E-08	8.488E-08	5.009E-10	6.068E-08	0.5919		
3007	-3.021E-08	8.714E-08	1.649E-09	5.87E-08			
2965	-3.298E-08	8.807E-08	1.717E-09	5.931E-08			
2748	-3.609E-08	9.4E-08	-3.323E-10	5.768E-08			
2461	-3.872E-08	9.833E-08	4.386E-10	6.312E-08			
2259	-4.354E-08	9.356E-08	2.855E-09	5.92E-08			
2129	-4.836E-08	9.74E-08	4.986E-10	6.039E-08			

Slika 10.9. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **brzih agregacijski kompetentnih CI/CIH stanica**. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine		Srednja vrijednost paralelene akceleracije	Standardna devijacija paralelene akceleracije	Srednja vrijednost okomite akceleracije	Standardna devijacija okomite akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
	3484	-1.355E-09	1.546E-08	-1.558E-10	1.518E-08	0.005936	F_S	0.09417
	9264	-2.009E-09	1.61E-08	-2.353E-10	1.488E-08	0.01347		0.06539
	9712	-3.084E-09	1.696E-08	-5.455E-11	1.361E-08	0.03132	F_{AP}	
	7718	-5.09E-09	1.805E-08	3.728E-11	1.231E-08	0.08134		0.06014
	5893	-7.732E-09	1.851E-08	-1.412E-10	1.143E-08	0.2138	F_{SAP}	
	4351	-9.803E-09	1.85E-08	-2.362E-11	1.15E-08	0.3412		0.3309
	3223	-1.228E-08	1.841E-08	6.707E-12	1.211E-08	0.4219	F_{SAO}	
	2252	-1.591E-08	1.721E-08	2.06E-10	1.315E-08	0.4032		0.1554
	1369	-1.819E-08	1.689E-08	8.98E-11	1.494E-08	0.5606	F_P	
	560	-2.025E-08	1.493E-08	-1.096E-10	1.841E-08	0.9799		0.3124
	94	-1.985E-08	1.318E-08	1.769E-09	1.911E-08	1.278		
	0					2.218		
	0					3.216		
	0					3.008		
	0							
	0							
	0							
	0							
	0							
	0							
	0							
	1925	-1.451E-09	1.331E-08	-1.449E-10	1.336E-08	0.005241		
	4548	-2.43E-09	1.391E-08	2.646E-10	1.384E-08	0.01781		
	4804	-3.764E-09	1.469E-08	-2.198E-10	1.382E-08	0.06018		
	4101	-5.169E-09	1.64E-08	-7.671E-11	1.425E-08	0.1285		
	2983	-7.395E-09	1.804E-08	-7.937E-11	1.572E-08	0.2522		
	1989	-8.824E-09	1.915E-08	3.089E-10	1.542E-08	0.2669		
	1378	-1.109E-08	2.155E-08	4.462E-11	1.777E-08	0.2851		
	861	-1.259E-08	2.336E-08	1.324E-09	1.826E-08	0.3476		
	526	-1.736E-08	2.476E-08	-5.419E-10	1.73E-08	0.484		
	315	-2.032E-08	2.775E-08	-2.035E-10	1.828E-08	1.135		
	207	-1.884E-08	2.688E-08	2.821E-09	1.913E-08	1.142		
	128	-2.949E-08	3.9E-08	1.507E-09	2.104E-08	2.359		
	85	-3.588E-08	3.43E-08	-1.264E-09	2.275E-08	3.008		
	52	-4.266E-08	3.153E-08	-1.156E-09	1.645E-08	3.075		
	28	-4.898E-08	3.41E-08	-6.529E-10	3.379E-08			
	13	-2.748E-08	3.3E-08	-5.094E-09	2.627E-08			
	8	-3.232E-08	2.862E-08	-9.482E-09	1.818E-08			
	13	-5.635E-08	5.645E-08	1.309E-08	3.059E-08			
	7	-8.638E-08	5.581E-08	2.993E-09	6.204E-09			
	4	-3.109E-08	3.181E-08	4.854E-09	2.102E-08			

Slika 10.10. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **vegetativnih AX2 stanica s jakim signalom na niskim frekvencijama**. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine	Srednja vrijednost paralelene komp. akceleracije	Standardna devijacija paralelene komp. akceleracije	Srednja vrijednost okomite komp. akceleracije	Standardna devijacija okomite komp. akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
986	1.613E-09	2.996E-08	-2.242E-10	2.935E-08	0.007736	F _S	0.06271
2496	4.534E-10	3.093E-08	3.143E-10	2.897E-08	0.01449		0.02166
3300	2.757E-10	3.182E-08	4.889E-10	2.943E-08	0.0367	F _{AP}	
3657	-6.555E-10	3.316E-08	-2.53E-10	3.062E-08	0.09772		0.05942
3750	-1.211E-09	3.649E-08	-1.908E-10	3.049E-08	0.1719	F _{SAP}	
3375	-2.651E-09	3.898E-08	3.27E-11	3.059E-08	0.2652		0.07108
3272	-3.999E-09	4.116E-08	-8.475E-10	3.147E-08	0.3977	F _{SAO}	
2982	-4.306E-09	4.4E-08	-6.206E-10	3.12E-08	0.4803		0.05599
2648	-4.903E-09	4.573E-08	6.128E-10	3.204E-08	0.5066	F _p	
2385	-7.311E-09	4.721E-08	-3.757E-10	3.167E-08	0.8418		0.1102
2197	-7.452E-09	4.925E-08	4.723E-10	3.219E-08	1.443		
1862	-9.489E-09	5.193E-08	-4.145E-10	3.289E-08	1.64		
1707	-9.656E-09	5.615E-08	-2.77E-10	3.272E-08	2.455		
1515	-1.33E-08	5.528E-08	3.338E-10	3.272E-08	4.501		
1304	-1.375E-08	5.7E-08	1.647E-09	3.163E-08			
1174	-9.974E-09	6.508E-08	1.365E-09	3.171E-08			
990	-1.665E-08	6.199E-08	1.027E-09	3.182E-08			
966	-1.998E-08	6.473E-08	-1.417E-09	3.274E-08			
790	-1.949E-08	6.707E-08	-1.926E-10	3.209E-08			
738	-2.509E-08	6.839E-08	1.847E-09	3.171E-08			
544	8.85E-10	2.897E-08	-2.249E-09	2.841E-08	0.007512		
1373	-2.387E-09	2.776E-08	7.829E-10	2.876E-08	0.0201		
1862	-3.1E-09	3.241E-08	-1.102E-10	3.034E-08	0.05345		
2001	-2.874E-09	3.769E-08	1.719E-11	3.267E-08	0.08198		
2032	-3.853E-09	3.809E-08	-2.948E-10	3.078E-08	0.1534		
1865	-4.438E-09	3.631E-08	1.461E-10	3.054E-08	0.2633		
1744	-3.517E-09	4.095E-08	9.923E-10	3.095E-08	0.3384		
1607	-4.808E-09	4.449E-08	-3.563E-10	3.24E-08	0.6017		
1427	-4.871E-09	4.669E-08	-1.477E-10	3.225E-08	0.7507		
1282	-3.362E-09	4.704E-08	-5.173E-10	3.51E-08	0.8915		
1262	-3.445E-09	5.324E-08	1.34E-10	3.417E-08	1.029		
1058	-1.226E-08	5.195E-08	1.108E-09	3.459E-08	1.989		
880	-7.108E-09	5.62E-08	9.063E-10	3.22E-08	2.3		
848	-1.037E-08	5.526E-08	8.989E-10	3.264E-08	4.551		
727	-1.462E-08	5.353E-08	-2.937E-10	2.948E-08			
657	-1.308E-08	6.459E-08	6.259E-10	3.718E-08			
577	-1.566E-08	6.387E-08	6.417E-11	2.982E-08			
558	-2.016E-08	6.074E-08	3.727E-10	3.205E-08			
449	-1.752E-08	6.33E-08	-1.307E-09	3.311E-08			
431	-2.481E-08	6.845E-08	-1.228E-09	3.097E-08			

Slika 10.11. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **agregacijski kompetentnih AX2 s jakim signalom na niskim frekvencijama**. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

Raspodjela brzine	Srednja vrijednost paralelene akceleracije	Standardna devijacija paralelene akceleracije	Srednja vrijednost okomite akceleracije	Standardna devijacija okomite akceleracije	Periodogram vektora brzine	Vrijednost pojedinih ciljnih funkcija	Vrijednost ukupne ciljne funkcije F
1968	-2.007E-10	1.634E-08	3.36E-11	1.606E-08	0.007247	F _S	0.06894
5013	-2.24E-10	1.696E-08	-8.268E-11	1.727E-08	0.01298	0.01798	
6084	-6.839E-10	1.906E-08	7.491E-11	1.861E-08	0.0365	F _{AP}	
5978	-1.147E-09	2.187E-08	-1.215E-10	2.021E-08	0.1042	0.1025	
5332	-2.683E-09	2.348E-08	-1.841E-10	2.141E-08	0.1906	F _{SAP}	
4532	-3.859E-09	2.618E-08	-3.874E-10	2.27E-08	0.2963	0.05409	
3854	-5.3E-09	2.874E-08	2.208E-10	2.361E-08	0.4649	F _{SAO}	
3005	-7.105E-09	3.151E-08	2.83E-10	2.488E-08	0.5433	0.07711	
2464	-9.218E-09	3.282E-08	1.108E-09	2.544E-08	0.5175	F _p	
1945	-1.155E-08	3.606E-08	3.18E-10	2.62E-08	0.9711	0.1214	
1508	-1.842E-08	3.646E-08	4.42E-10	2.662E-08	1.612		
1286	-1.63E-08	4.038E-08	6.88E-10	2.694E-08	1.581		
1017	-1.928E-08	4.115E-08	-7.534E-10	2.757E-08	2.32		
760	-2.415E-08	4.047E-08	-9.519E-10	2.857E-08	3.71		
655	-2.656E-08	4.372E-08	6.178E-10	2.944E-08			
478	-2.856E-08	4.262E-08	-2.767E-10	2.851E-08			
417	-3.004E-08	4.498E-08	-8.323E-10	2.867E-08			
331	-3.165E-08	4.884E-08	1.408E-09	3.294E-08			
226	-3.458E-08	5.307E-08	1.339E-10	2.894E-08			
221	-3.854E-08	5.698E-08	-5.332E-10	3.035E-08			
2322	-1.09E-09	1.89E-08	2.88E-10	1.86E-08	0.008306		
5789	-2.34E-09	1.94E-08	1.49E-10	1.90E-08	0.02065		
6987	-2.96E-09	2.03E-08	2.26E-10	1.92E-08	0.0491		
7006	-4.73E-09	2.26E-08	2.52E-10	2.07E-08	0.09824		
6191	-5.92E-09	2.46E-08	5.28E-13	2.18E-08	0.2409		
5241	-6.53E-09	2.73E-08	1.49E-10	2.25E-08	0.3117		
4361	-7.53E-09	2.99E-08	-1.02E-10	2.33E-08	0.3521		
3355	-1.01E-08	3.17E-08	-2.47E-10	2.54E-08	0.4107		
2723	-1.06E-08	3.27E-08	2.99E-10	2.43E-08	0.4405		
2136	-1.32E-08	3.44E-08	-7.16E-11	2.64E-08	0.8203		
1849	-1.21E-08	3.76E-08	-9.10E-10	2.71E-08	1.452		
1445	-1.76E-08	4.09E-08	2.23E-10	2.82E-08	2.105		
1176	-1.95E-08	4.07E-08	-6.10E-10	2.83E-08	2.45		
908	-2.16E-08	4.10E-08	-8.35E-10	2.78E-08	3.59		
730	-2.27E-08	4.17E-08	9.54E-10	2.80E-08			
574	-2.45E-08	4.51E-08	2.33E-09	3.07E-08			
451	-2.80E-08	4.57E-08	6.18E-10	2.89E-08			
360	-3.14E-08	5.03E-08	1.87E-09	3.02E-08			
302	-3.34E-08	5.12E-08	-1.72E-09	3.19E-08			
267	-3.65E-08	5.71E-08	-1.86E-09	3.34E-08			

Slika 10.12. Uspješnost procjene parametara za podskupinu **vegetativnih CI/CI*** stanica s jakim signalom na niskim frekvencijama. Gornja tablica sadrži vrijednosti karakteristika simulirane populacije stanica te vrijednosti ciljnih funkcija. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti karakteristika referentne biološke populacije.

11. Životopis

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Vlatka Antolović
Datum rođenja: 10.07.1981.
Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

OBRAZOVANJE

2008. – danas Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij „Molekularne bioznanosti”, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku i Institut Ruđer Bošković u Zagrebu;
modul: bioinformatika

2007. mag. ing. molekularne biotehnologije;

1999. – 2007. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu;
studij: biotehnologija; smjer: biokemijsko-mikrobiološki

1995. – 1999. XV. Gimnazija (MIOC), Zagreb

RADNO ISKUSTVO

ožujak 2008. – danas Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska;
znanstveni novak u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju Zavoda za molekularnu biologiju

srpanj 2007. – kolovoz 2007. Technical University of Lodz, Lodz, Poland;
Faculty of Biotechnology and Food Sciences; studentska praksa

studeni 2005. – svibanj 2006. Industrial Investment Council GmbH, Berlin, Germany;
Life Sciences and Chemical Department; praksa

ožujak 2003. – listopad 2003. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska;
Zavod za molekularnu biologiju; studentska praksa

ČLANSTVO U STRUČNIM I ZNANSTVENIM UDRUGAMA

- Hrvatsko biofizičko društvo
- Hrvatsko društvo za teorijsku i matematičku biologiju (HDTMB)
- Hrvatsko mikroskopijsko društvo
- International Society for Computational Biology (ISCB)

USAVRŠAVANJA

- FEBS Practical Course in Computational Biology, Split, Hrvatska, 2009.

ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Antolović, Vlatka; Šmuc, Tomislav; Weber, Igor.
Cluster analysis of the cell migration in *Dictyostelium* // Dicty 2014, Annual International Dictyostelium Conference. Potsdam, Njemačka, 2014.
2. Antolović, Vlatka; Šmuc, Tomislav; Weber, Igor.
Characterizing cell migration in actin cytoskeleton mutants of *Dictyostelium discoideum* // The 14th European Light Microscopy Initiative (ELMI2014). Oslo, Norveška, 2014.
3. Antolović, Vlatka; Šmuc, Tomislav; Weber, Igor.
Characterizing the movement of different actin cytoskeleton mutants of *Dictyostelium discoideum* // Computational Biology and Innovation Symposium. Dublin, Irska, 2013.
4. Marinović, Maja; Antolović, Vlatka; Filić, Vedrana; Faix, Jan; Weber, Igor.
Role of Rac1 GTPase in the regulation of *Dictyostelium* cell migration // Novel Biophysical Approaches in the Investigation of the Cytoskeleton, The 27th European Cytoskeletal Forum Meeting. Pečuh, Mađarska, 2012.
5. Antolović, Vlatka; Weber, Igor.
A system for monitoring and analyzing cell motility // First meeting of the Croatian Association for Cancer Research with international participation HDIR-1 „From Bench to Clinic”. Zagreb, Hrvatska, 2010.

Znanstveni radovi:

1. Antolović, Vlatka; Marinović, Maja; Filić, Vedrana; Weber, Igor (2014) A simple optical configuration for cell tracking by dark-field microscopy. *J. Microbiol. Methods*, 104, 9-11.
2. Maciag, Agnieszka; Milaković, Dragana; Christensen H. Henriette; Antolović, Vlatka; Kalemba, Danuta (2007) Essential oil composition and plant-insect relations in Scots pine (*Pinus sylvestris L.*). *Food Chemistry and Biotechnology*, 71, 71–95.