

# Analiza membranske difuzibilnosti čestica liganada uz prisutnost difuzibilnih receptora

---

**Buljan, Bruno**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:060703>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
FIZIČKI ODSJEK

Bruno Buljan

ANALIZA MEMBRANSKE DIFUZIBILNOSTI  
ČESTICA LIGANADA UZ PRISUTNOST  
DIFUZIBILNIH RECEPTORA

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
FIZIČKI ODSJEK

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI  
STUDIJ FIZIKA; SMJER ISTRAŽIVAČKI

**Bruno Buljan**

Diplomski rad

**Analiza membranske difuzibilnosti  
čestica liganada uz prisutnost  
difuzibilnih receptora**

Voditelj diplomskog rada: prof. dr. sc. Ana-Sunčana Smith

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

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

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

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

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

Zagreb, 2018.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani-Sunčani Smith i Mislavu Cvitkoviću, mag. phys., na ukazanom strpljenju i stručnosti pri izradi ovoga diplomskog rada na Zavodu za fizičku kemiju na Institutu Ruđer Bošković.*

*Također zahvaljujem svim kolegama u Grupi za računalne bioznanosti na Institutu Ruđer Bošković na svim savjetima i poučnim razgovorima.*

*Ovaj rad podržan je projektom ERC StG MembranesAct.*

## Sažetak

U ovome diplomskom radu je analitički i pomoću računalnih simulacija proučena difuzija čestica u membrani. Čestice su razmještene u dvije paralelno postavljene membrane i mogu difundirati po svakoj membrani te stvarati premošćujuće veze koje imobiliziraju čestice u vezi. Izvedeni su izrazi koji opisuju gustoću premošćujućih veza i efektivni difuzijski koeficijent čestica. Kroz Monte Carlo simulacije je proučena ovisnost tih dviju veličina o intrinzičnom slobodnom difuzijskom koeficijentu čestica na jednoj odnosno drugoj membrani, o energiji vezanja pri stvaranju čestičnog intermembranskog kompleksa i o koncentraciji čestica na jednoj odnosno drugoj membrani. Najzanimljiviji rezultat simulacija je porast efektivnog difuzijskog koeficijenta čestica na membrani s porastom koncentracije čestica na istoj membrani. Sličan fenomen je opažen u simulacijama i analitički proučen u analognom sustavu s nepomičnim česticama na jednoj od membrana [1]. Ispitani teorijski modeli za efektivni difuzijski koeficijent pokazuju zadovoljavajuće slaganje u područjima niskih koncentracija čestica. Analiza slaganja simulacija s teorijskim modelima na visokim koncentracijama čestica upućuje na buduće pristupe pri teorijskom razmatranju efektivne difuzije u biološkim sustavima.

Ključne riječi: difuzija, anomalna difuzija, difuzija u membrani, ligand, receptor

# Analysis of ligand particle membrane diffusibility in presence of diffusible receptors

## Abstract

In this master thesis we study diffusion of particles in a membrane by means of numerical simulations and theoretical analysis. The particles are randomly distributed in two membranes set parallel to each other and are able to diffuse within membrane as well as make bridging complexes spanning the two membranes which make the particles in a complex immobile. We proposed expressions for the density of bridging complexes and for the effective diffusion coefficient of the particles. Using Monte Carlo simulations we investigated the dependence of the aforementioned physical quantities on the physical parameters of the system. These are intrinsic mobility of particles on both membranes, binding energy of the formation of the bridging complex and the concentration of particles on both membranes. As a notable result we report the increase in effective diffusion coefficient with the increase of the concentration of diffusing particles on the same membrane. A similar phenomenon has already been detected in simulations and studied analytically in an analogous system with immobilized particles on one of the membranes [1]. The analytical expressions for the diffusion coefficient we proposed here are in agreement with simulation data for low particle concentrations. Disagreement of the simulation data and analytical models at high particle concentrations hints on possible future approaches to modelling membrane diffusion in biological systems.

Keywords: diffusion, anomalous diffusion, diffusion in membranes, ligand, receptor

# Sadržaj

|          |                                                                                               |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Uvod</b>                                                                                   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Normalna difuzija . . . . .                                                                   | 1         |
| 1.2      | Anomalna difuzija . . . . .                                                                   | 5         |
| 1.3      | Difuzija u staničnoj membrani . . . . .                                                       | 9         |
| 1.4      | Postavljanje problema . . . . .                                                               | 12        |
| <b>2</b> | <b>Teorijska podloga</b>                                                                      | <b>14</b> |
| 2.1      | Difuzijski koeficijent liganada bez prisutnosti receptora . . . . .                           | 14        |
| 2.2      | Difuzijski koeficijent liganada u prisutnosti receptora . . . . .                             | 16        |
| 2.2.1    | Prvi pokušaji modeliranja efektivnog difuzijskog koeficijenta . .                             | 16        |
| 2.2.2    | Fenomenološki izvod . . . . .                                                                 | 17        |
| 2.2.3    | Izvod pomoću master jednadžbe . . . . .                                                       | 21        |
| 2.3      | Statička termodinamička svojstva sustava . . . . .                                            | 26        |
| <b>3</b> | <b>Simulacije i obrada rezultata</b>                                                          | <b>30</b> |
| 3.1      | Simulacije . . . . .                                                                          | 30        |
| 3.2      | Obrada rezultata . . . . .                                                                    | 33        |
| <b>4</b> | <b>Rezultati i rasprava</b>                                                                   | <b>35</b> |
| 4.1      | Ovisnost broja vezanih stanja o koncentracijama liganada i receptora .                        | 35        |
| 4.2      | Ovisnost difuzijskog koeficijenta o relativnoj pokretljivosti liganada i receptora . . . . .  | 37        |
| 4.3      | Ovisnost difuzijskog koeficijenta o energiji vezanja liganada i receptora                     | 39        |
| 4.4      | Ovisnost efektivnog difuzijskog koeficijenta o koncentracijama liganada i receptora . . . . . | 41        |
| 4.4.1    | Prikaz rezultata simulacija . . . . .                                                         | 41        |
| 4.4.2    | Usporedba s teorijskim modelima . . . . .                                                     | 43        |
| <b>5</b> | <b>Zaključak</b>                                                                              | <b>48</b> |

# 1 Uvod

U ovom diplomskom radu želja nam je fizičkim modelom i simulacijama proučiti gibanje proteina u staničnoj membrani. Takvo gibanje je u svojoj prirodi nasumično i primjer je *složene difuzije* po *biološkoj* dvodimenzijskoj površini.

Cilj ovog uvoda u problematiku ovoga diplomskog rada je sumirati važne rezultate prethodećeg znanstvenog rada na ovome području i objasniti neke češće biološke pojmove i fenomene koji se susreću u biološkoj difuziji. Tri potpoglavlja — *Normalna difuzija*, *Anomalna difuzija* i *Difuzija u staničnoj membrani* razgraničavaju taj znanstveni rad u tri zasebnije cjeline. U zadnjem potpoglavlju se jasno definira sustav koji analiziramo i problem kojim se bavimo u ovome diplomskom radu.

## 1.1 Normalna difuzija

Difuzija je proces nasumičnoga gibanja neke čestice u mediju i jedan je od najočitijih fizičkih primjera nasumičnih procesa. Difuzija kao proces se počela sustavno proučavati s pokusima Roberta Browna 1827. godine, pa se stoga i difuzijsko gibanje često naziva *Brownovim gibanjem* [2]. Godine 1855. A. Fick izvodi Fickove zakone difuzije [3]. Fick izvodi svoj prvi zakon promatrajući gibanje čestica u nekoj točki  $(x, t)$  u jednoj dimenziji (dalje: 1D). Pretpostavljajući u 1D da se pola čestica giba lijevo, a pola desno, računa da ukupni tok čestica  $J$  kroz neku točku  $(x, t)$  udesno iznosi  $-\frac{1}{2}(N(x + dx, t) - N(x, t))$ . Djeleći tok s površinom kroz koju se tok događa i vremenom  $dt$ , dobivamo izraz

$$J = -\frac{N(x + dx, t) - N(x, t)}{2a dt}. \quad (1.1)$$

Proširimo li izraz sa  $dx^2$ , i pustimo limes takav da

$$\frac{dx^2}{a dt} \rightarrow D \quad (1.2)$$

i

$$\frac{N(x, t)}{dx} \rightarrow c(x, t) \quad (1.3)$$



dobivamo upravo prvi Fickov zakon:

$$J = -D \frac{\partial c(x, t)}{\partial x}, \quad (1.4)$$

gdje  $D$  označava difuzijski koeficijent. Drugi Fickov zakon je posljedica očuvanja mase i dobije se primjenom Gaussova teorema:

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} D \frac{\partial c(x, t)}{\partial x}. \quad (1.5)$$

1905. g. slijede novi teorijski rezultati o Brownovom gibanju. Sutherland, Einstein i Smoluchowski su proučavajući Brownovo gibanje objavili svaki zasebno svoje inačice fluktuacijsko-disipacijskog teorema, koji povezuje koeficijent fluktuacije tj. difuzijski koeficijent  $D$ , s koeficijentom disipacije, tj. koeficijentom trenja  $\eta$  Stokesove viskozne sile na kuglicu polumjera  $r$ :

$$D = \frac{k_B T}{6\eta\pi r} = \frac{k_B T}{\zeta}, \quad (1.6)$$

gdje je  $T$  temperatura, a  $k_B$  Boltzmanova konstanta [4–6].

Einstein 1905. g. promatra difuziju statistički i pod okriljem atomske teorije prvi izvodi Fickov drugi zakon mikroskopski analizirajući Brownovo gibanje počevši od 3 pretpostavke koje se tiču statistike nasumičnih koraka čestice u gibanju:

- Nasumični koraci čestica u mediju nisu prostorno korelirani jer čestice međusobno ne međudjeluju.
- Koraci jedne čestice u vremenu nisu međusobno korelirani u vremenu na vremenskim skalama koje nas zanimaju.
- Raspodjela nasumičnih koraka je uska i simetrična.

Odatle Einstein zaključuje da su u trenutku  $t + \tau$  čestice koje se nalaze na mjestu  $x$ , dane koncentracijom  $c(x, t + \tau)$ , suma svih čestica na nekim drugim mjestima, udaljenim za  $\Delta$ , koje su s gustoćom vjerojatnosti  $\Phi(\Delta)$  skočile na mjesto  $x$  uključno s česticama s mjesta  $x$  koje su ostale na mjestu s gustoćom vjerojatnosti  $\Phi(0)$ , odnosno:

$$c(x, t + \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} c(x - \Delta, t) \Phi(\Delta) d\Delta. \quad (1.7)$$

Kako su  $\Delta$  i  $\tau$  mali, možemo raspisati  $c(x, t + \tau)$  i  $c(x - \Delta, t)$  pomoću Taylorova razvoja:

$$c(x, t + \tau) = c(x, t) + \tau \frac{\partial c}{\partial \tau} + \mathcal{O}(\tau^2) \quad (1.8)$$

$$c(x - \Delta, t) = c(x, t) - \Delta \frac{\partial c}{\partial x} + \frac{\Delta^2}{2} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \mathcal{O}(\Delta^3). \quad (1.9)$$

Uvrštavajući Taylorove razvoje u prethodni izraz i sređujući članove dobivamo:

$$c(x, t) + \tau \frac{\partial c}{\partial t} = c(x, t) \int_{-\infty}^{+\infty} \Phi(\Delta) d\Delta - \frac{\partial c}{\partial x} \int_{-\infty}^{+\infty} \Delta \Phi(\Delta) d\Delta + \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\Delta^2}{2} \Phi(\Delta) d\Delta. \quad (1.10)$$

Prvi član s desne strane se izvrjednjava u 1 zbog normalizacije, a drugi u nula zbog simetričnosti funkcije  $\Phi(\Delta)$  po pretpostavci. Uz definiciju difuzijskoga koeficijenta

$$D = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\Delta^2}{2\tau} \Phi(\Delta) d\Delta, \quad (1.11)$$

dobije se drugi Fickov zakon polazeći od mikroskopskih detalja difuzije:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \quad (1.12)$$

Uz početne uvjete:  $c(x, t = 0) = c_0 \delta(x)$  i  $\int c(x, t) dx = N$  za rješenje prethodne jednadžbe u 1D dobivamo

$$c(x, t) = \frac{N}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{\frac{-x^2}{4Dt}}, \quad (1.13)$$

pri čemu je  $N$  ukupan broj čestica.

Einstein je na tom rezultatu izračunao srednju kvadratnu udaljenost od ishodišta gibanja (eng. *mean square displacement*, MSD) i poprilično jednostavno dobio (za slučaj trodimenzijskog Brownovog gibanja):

$$\langle x^2(t) \rangle = 6Dt. \quad (1.14)$$

Dobiveni rezultat temeljno je svojstvo normalne difuzije u trima dimenzijama koje je i potvrđeno experimentima J. Perrina 1908. g. [7, 8] i govori o uspješnosti Einsteinova pristupa.

J. Perrin je izveo eksperiment u kojem je promatrao disperziju finih čestica u vodenom stupcu. Nakon pažljivo određenog mjerenja promjene položaja pojedinih čestica i

promjene koncentracije čestica s visinom, Perrin je uspio na dva neovisna načina doći do Boltzmanove konstante  $k_B$  tj. Avogadrova broja  $N_A$ . Naime, čestice koje su više u stupcu s vodom će biti na višoj energiji te će ta distribucija slijediti Boltzmanov zakon razdiobe i omogućiti direktno računanje  $k_B$ . S druge strane gibanje pojedinih čestica i njihov MSD nam daje vrijednost difuzijske konstante (jednadžba (1.14)) odakle prema fluktuacijsko-disipacijskom teoremu (1.6) možemo dobiti  $k_B$  na jedan sasvim drugačiji način, poznavajući prethodno viskoznost tekućine i promjer čestica koje smo pratili. Taj rezultat se općenito smatra jednim od prvih eksperimentalnih potvrda čestične teorije materije.

Daljnja razmišljanja o nasumičnim procesima na početku 20. stoljeća potaknula su P. Langevina na drugačiji pristup gibanju Brownove čestice [9]. On počinje od drugog Newtonovog zakona, ali uz Stokesovu silu trenja proporcionalnu brzini, uvodi i nasumičnu silu  $X(t)$  koja nastaje od nesavršeno izotropnog prijenosa impulsa s medija na česticu (kako je to još i Einstein implicitno zaključio):

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = -6\eta\pi r \frac{dx}{dt} + X(t). \quad (1.15)$$

Ta „nasumična sila“ ima svoja statistička obilježja: srednju vrijednost jednaku nuli i konačnu varijancu. Langevinov cilj pritom nije bio izračunati stvarne trajektorije  $x(t)$  dane čestice nego statističke veličine poput MSD-a koji se mogu izvući iz takvog nasumičnog gibanja — put na koji je ukazao Einstein 1905. g.

Uvodeći sljedeće transformacije:

$$x \frac{d^2x}{dt^2} = \frac{1}{2} \frac{d^2x^2}{dt^2} - \left( \frac{dx}{dt} \right)^2 \quad (1.16)$$

$$x \frac{dx}{dt} = \frac{1}{2} \frac{dx^2}{dt} \quad (1.17)$$

početnu jednadžbu se lako prevede u diferencijalnu jednadžbu za MSD uprosječnjavajući po ansamblu čestica:

$$\frac{d^2 \langle x^2 \rangle}{dt^2} + \frac{6\eta\pi r}{m} \frac{d \langle x^2 \rangle}{dt} = \langle v^2 \rangle = \frac{k_B T}{m}, \quad (1.18)$$

gdje smo u zadnjem koraku iskoristili teorem o ekviparticipiji energije. Dobivena dife-

rencijalna jednadžba je lako rješiva:

$$\frac{d\langle x^2 \rangle}{dt} = \frac{k_B T}{3\eta\pi r} + C \exp\left(-\frac{6\pi\eta r}{m}t\right), \quad (1.19)$$

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{3\eta\pi r}t + \langle x_0^2 \rangle, \text{ za } t \gg \frac{m}{6\pi\eta r} \approx 10^{-8} \text{ s.} \quad (1.20)$$

Dobiveno rješenje je očekivano i odgovara Einsteinovu MSD-u i fluktuacijsko-disipacijskom teoremu (1.6).

Proširenje Einsteinove ideje s relaksacijom trećeg Einsteinova postulata došlo je u vidu Fokker-Planckove jednadžbe (tj. Chapman-Kolmogorovljeve ili master jednadžbe) [10–12]. U njoj raspodjela nasumičnih koraka  $\Phi(\Delta)$  nije simetrična oko nule i ima netrivialnu srednju vrijednost. Također  $\Phi(\Delta) \rightarrow \Phi(\Delta, x)$  kako bi se ostavilo mjesta za prostorno ovisnu modifikaciju raspodjele nasumičnih koraka. Vrijedi:

$$c(x, t + \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} c(x - \Delta, t) \Phi(\Delta, x - \Delta) d\Delta. \quad (1.21)$$

Nakon Taylorovih ekspanzija dobivamo Fokker-Planckovu opću transportnu jednadžbu:

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} (v(x, t)c(x, t)) + \frac{\partial^2}{\partial x^2} (D(x, t)c(x, t)). \quad (1.22)$$

Taj rezultat je u matematici poznat kao Chapman-Kolmogorovljeva jednadžba uz zamjenu  $c(x, t) \rightarrow P(x, t)$  i  $D(x, t) \rightarrow \frac{\sigma^2(x, t)}{2}$  ili kao *difuzijsko-adveksijska jednadžba* u biofizici i geofizici.

## 1.2 Anomalna difuzija

Uz daljnje eksperimente i teorijska proučavanja Brownova gibanja pokazano je da je linearna evolucija MSD-a u vremenu (1.14) posljedica zakona o velikim brojevima koji dovodi to toga da je raspodjela sumā infinitezimalnih koraka Brownove čestice, koja god bila prava priroda te podliježuće raspodjele, Gaussova raspodjela, te vodi do prethodno spomenutih rješenja difuzijske jednadžbe i linearne evolucije MSD-a u vremenu [13, 14].

Naime, zakon velikih brojeva ili eng. *central limit theorem* (dalje: CLT) tvrdi da ako promatramo raspodjelu srednjih vrijednosti uzorkovanih nizova brojeva iz proizvoljne raspodjele  $P(x)$ , ta raspodjela će biti Gaussova. Tako u slučaju Brownove čestice, čestica je izložena nizu infinitezimalnih pomaka nepoznate raspodjele, međutim ono

što mi bilježimo kao pomak čestice je suma tih koraka učinjenih u nekom kratkom ali konačnom vremenskom intervalu — i kao takve, te sume su raspodijeljene gausovski.

Drugim riječima, ako je raspodjela koraka  $\Phi(\Delta)$  Gaussova, MSD je proporcionalan vremenu, a ako MSD nije linearan u vremenu to znači da postoje korelacije u sustavu koje će narušavati Einsteinove postulate o neovisnosti koraka u prostoru i vremenu. Upravo takve nelinearne propagacije MSD-a su nađene u mnogim biološkim [15, 16] i čvrsto-stanjskim eksperimentima [17], pa ovaj rezultat izravno govori o samoj mikroskopskoj prirodi takvih procesa. Otkrivanje nelinearnih MSD-ova u eri poluvodiča omogućeno je napretkom mjerenja difuzijskih koeficijenata čestica u kristalima mjerenjem raspršenja zračenja na tim česticama [18].

Prema van Hooveu [19], gustoća vjerojatnosti da se zatekne čestica na mjestu  $(\mathbf{r}, t)$ ,  $P(\mathbf{r}, t)$ , nakon što je bila locirana u  $\mathbf{r} = 0$  u  $t = 0$  povezana je s gustoćom difundirajućih čestica  $\rho(\mathbf{r}', t) = \delta(\mathbf{r}' - \mathbf{r}(t))$  gdje  $\mathbf{r}(t)$  označava vremenski ovisan položaj difundirajuće čestice:

$$P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}'', t' - t'') = V \langle \rho(\mathbf{r}', t') \rho(\mathbf{r}'', t'') \rangle. \quad (1.23)$$

Ovdje se uprosječenje umnoška dviju gustoća naziva van Hooveovom autokorelacijskom funkcijom, a  $P(\mathbf{r}' - \mathbf{r}'', t' - t'')$  se interpretira kao vjerojatnost da čestica prijeđe udaljenost  $\mathbf{r}' - \mathbf{r}''$  u vremenu  $t' - t''$ .  $V$  je volumen materijala kojeg promatramo, a uprosječenje se odnosi na uprosječenje u vremenu:  $\langle \phi(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \int_0^T \phi(t + t') dt' / T$  [19, 20].

Vjerojatnost  $P(\mathbf{r}, t)$  se može prebaciti u Fourierovu domenu frekvencije i valnog broja i tada se naziva dinamičkim strukturnim faktorom:

$$S(\mathbf{k}, \omega) = \frac{1}{\pi} \int d\mathbf{r} \int dt e^{i(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})} P(\mathbf{r}, t). \quad (1.24)$$

Dinamički strukturni faktor je bitan jer je njegov realni dio izravno proporcionalan prostorno i energijski ovisnom diferencijskom udarnom presjeku što je posljedica proporcionalnosti  $P(\mathbf{r}, t)$  s gustoćom čestica na kojoj se vrši raspršenje [21]:

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega} = Na^2 \sqrt{\frac{E_{out}}{E_{in}}} \Re(S(\mathbf{k}, \omega)). \quad (1.25)$$

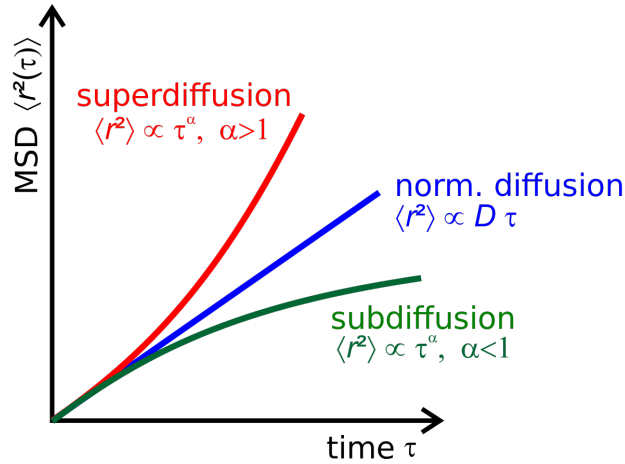
Prema tome, inverznim Fourierovim transformatom diferencijskoga udarnog presjeka možemo dobiti  $P(x, t)$  ili izravnije, iz dinamičkoga strukturnog faktora možemo dobiti

difuzijski koeficijent [21]:

$$D = \lim_{\omega \rightarrow 0} \left( \lim_{k \rightarrow 0} \pi \frac{\omega^2}{k^2} \Re(S(\mathbf{k}, \omega)) \right) \quad (1.26)$$

što je i cilj eksperimenata poduzetih u ovome području.

Nelinearna ovisnost MSD-a o vremenu formalno se naziva anomalnom difuzijom i vrijedi *a priori* da  $\langle x^2(t) \rangle = D_\alpha \left( \frac{t}{t_c} \right)^\alpha$ ,  $\alpha > 0$ ,  $\alpha \neq 1$ . Ukoliko je koeficijent  $\alpha < 1$  bavimo se subdifuzijom, a ako je  $\alpha > 1$ , bavimo se superdifuzivnim fenomenom. Tipični MSD-traceovi za subdifuziju, superdifuziju i normalnu difuziju su prikazani na slici 1.1.



Slika 1.1: Prikaz  $MSD(t)$  u slučaju normalne difuzije, anomalne subdifuzije i superdifuzije. Slika je preuzeta s *Wikipedije*.

Za potrebe analize anomalne difuzije dosad je smišljeno nekoliko teorijskih modela. Neki od njih su *fraktalno Brownovo gibanje* (eng. *fractional Brownian motion*, FBM), *neprekidni nasumični hod* (eng. *continuous time random walk*, CTRW) i Lorentzov model. Svaki od njih modelira anomalnu difuziju na temelju različitih pretpostavki.

Izrazito pojednostavljeno rečeno, FBM je model koji je superpozicija dvaju fluktuacijskih procesa: primarni gaussovski šetač kojem se pribrajaju negaussovski koraci iz dodatne raspodjele koja unosi korelacije u sustav [22, 23].

CTRW je model koji uz standardnu Einsteinovu raspodjelu prostorne duljine koraka  $\Phi(\Delta)$  ima dodatnu raspodjelu  $\Psi(\tau)$  vremena čekanja na sljedeći korak. Raspodjela  $\Psi(\tau)$  je odabrana tako da ima beskonačno prosječno vrijeme čekanja i beskonačnu varijancu te se stoga CLT ne može primjeniti na ovaj model. Posljedica toga je u vremenu nelinearni MSD [24–26].

Lorentzov model je mezoskopski i topološki pristup modeliranju anomalne difu-

zije. Potječe iz istraživanja difuzije u poroznim materijalima i kao što je slučaj u tim materijalima, u modelu za D-dimenzijski prostor se smještaju geometrijski oblici koji izuzimaju volumen kroz koji se može difundirati. Čestice koje difundiraju odbijaju se na preprekama i zaobilaze ih, što produžuje difuzijsko vrijeme između dvije točke i smanjuje difuzijski koeficijent. Za takav model je karakteristična perkolacijska granica: za određenu koncentraciju i parametre geometrije difuzijsko vrijeme između dviju točaka postaje beskonačno [20].

Od sredine 20. st. do danas nađeno je mnoštvo primjera anomalne difuzije u različitim fizičkim okruženjima — od polimernih mreža, poroznih materijala, preko bioloških sustava do atmosferskih fenomena [27]. Dok se u jako koreliranim sustavima poput stakala često vidi potpuna anomalna difuzija, tj. nelinearno ponašanje MSD-a na svim vremenskim skalama, ono što se najčešće nalazi u biološkim eksperimentima je prijelazna anomalna difuzija gdje se na određenim vremenskim i prostornim skalama u standardnu difuziju upliću dodatni procesi koji je usporavaju. Na velikim vremenskim skalama difuzija je normalna ( $\text{MSD} \sim t$ ), ali difuzijski koeficijent je reskaliran u odnosu na onaj koji bi bio da nema dodatne interakcije (korelacije) među česticama u mediju. Takav je i slučaj biološke difuzije u stanicama i po staničnim površinama, kao što pokazuju mnogi eksperimenti [20].

Moderni eksperimenti koji proučavaju difuziju u biološkim materijalima potvrđuju postojanje anomalne i tranzijentno anomalne difuzije, a teorijska proučavanja tih procesa uočavaju tri fenomena koji doprinose takvom difuzijskom ponašanju: već spomenuti uhvat i gužva, te polimorfiju difundirajućih čestica [28].

Eksperimentalne tehnike koje se koriste u istraživanju bioloških sustava se ugrubo mogu podijeliti na tehnike koje prate pojedinačne čestice i tehnike koje prate uprosječno ponašanje skupa čestica. U prvu skupinu spadaju jednočestične mikroskopske (eng. *single particle tracking*, SPT) tehnike koje koriste mikroskope visoke razlučivosti i u realnom vremenu prate gibanje označene čestice [29]. U drugu skupinu spadaju mikroskopsko-fluorescencijske tehnike: FRET (eng. *Förster Resonance Energy Transfer*) [30], FRAP (eng. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) [31] i FCS (eng. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) [32, 33].

### **1.3 Difuzija u staničnoj membrani**

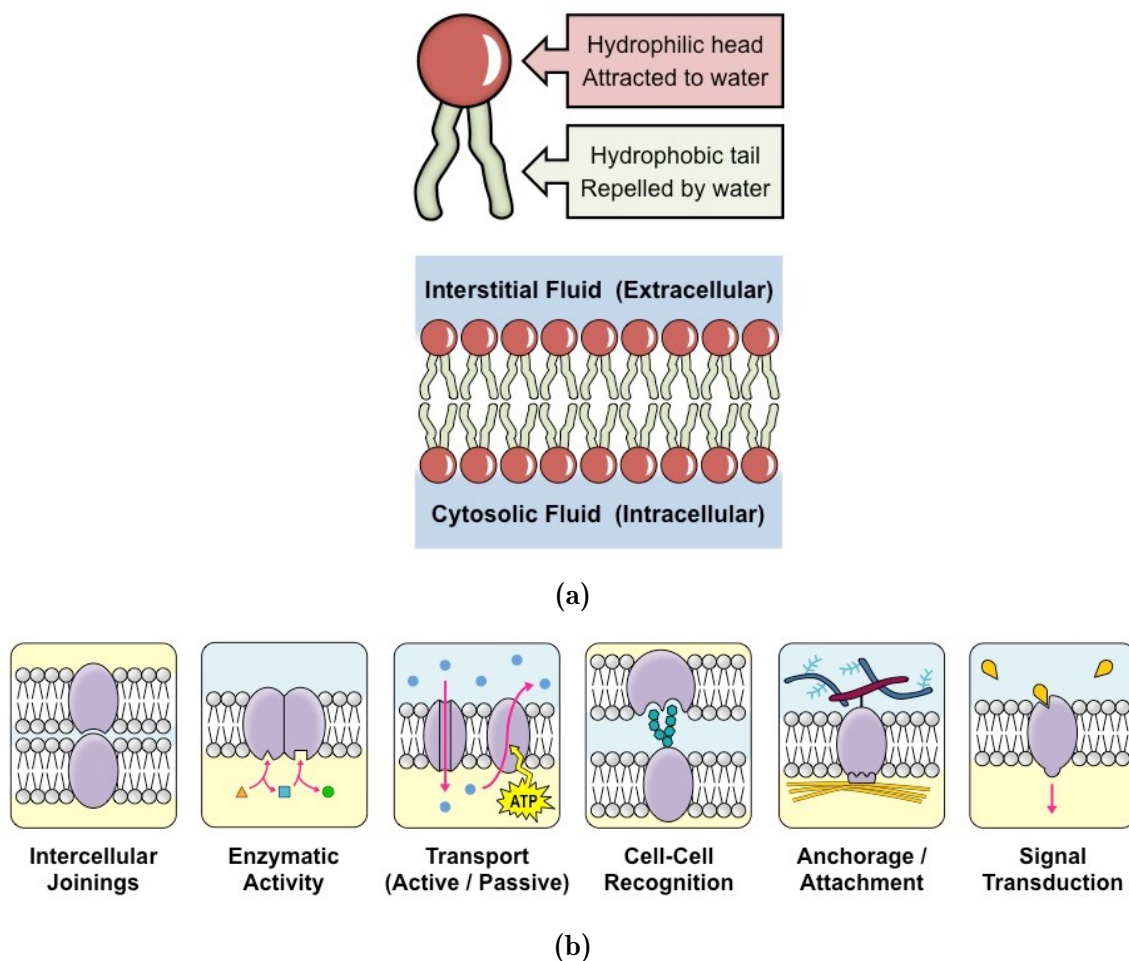
Stanična membrana se sastoji od fosfolipidnog dvosloja amfifilnih molekula organiziranih tako da su polarni dijelovi molekula orijentirani prema vodenom mediju — staničnom okolišu i staničnoj citoplazmi — a nepolarni dijelovi su orijentirani jedan prema drugome, tj. nalaze se unutar fosfolipidnog dvosloja. Molekule fosfolipida se mogu lateralno gibati u tom dvosloju jer ne zauzimaju kristalnu strukturu. Prema tome, membranu možemo promatrati kao tekuću fazu u dvije dimenzije. U taj tekući mozaik uronjene su različite makromolekule, najčešće proteini, koje mogu zauzimati i više od 50% površine membrane [34]. Takav smještaj dirigiran je Van der Waalsovima privlačnim i odbojnim elektrostatskim silama koje osiguravaju stabilno smještanje u membranu time što je dio molekule opet hidrofoban, a dio hidrofilan. Takva struktura je prikazana na slici 1.2(a).

Uloga makromolekula u membrani je različita (slika 1.2(b)), a najčešće posreduju pri izmjeni tvari i signala između okoliša i unutrašnjosti stanice. Neki od proteinskih signalizacijskih sustava su višekomponentni i za njihovo funkcioniranje je presudno nasumično gibanje po površini stanice, susretanje te vezanje s drugim komponentama signalizacijskog sustava [35, 36]. Prema tome, lateralna difuzija u membrani je jedan od temeljnih fizičkih procesa za razumjeti fizičku pozadinu osnovnih funkcija proteina.

U biološkim procesima u kojima sudjeluju proteini osim čiste difuzije, tj. Brownovog gibanja gdje je interakcija promatrane čestice s ostalim česticama nespecifična, može doći do specifičnog vezanja promatrane čestice, koju zovemo ligand, za neku drugu, koju zovemo receptor. Ligandom se najčešće naziva čestica manje mase i veće pokretljivosti od receptora. Specifično vezivanje je najčešće i slučaj u višekomponentnim biološkim membranama. Vezivanje dviju ili više makromolekula u veće komplekse je najčešće privremeno i biokemijski se doživljava kao vezivanje liganda za njegovo vezno mjesto na receptoru. Takvo vezivanje često ima i podliježuće biokemijsko značenje, ali osim toga usporava difuziju liganada, tako da je efektivni difuzijski koeficijent na makroskopskim vremenskim skalama zbog vezanja reskaliran u odnosu na slobodni difuzijski koeficijent u čistoj membrani bez receptora.

Difuzija liganada u membrani nije neometana ili slobodna, nego je, kako je već rečeno, isprekidana boravcima na receptorskom veznom mjestu, a taj kompleks zbog svoje veličine i složenog oblika se može smatrati nepokretnim, tako da je vrijeme koje je ligand proveo u difuziji od mjesta A do mjesta B produljeno za boravke na receptorima





Slika 1.2: Shematski prikaz (a) stanične membrane i (b) raznih uloga proteina u staničnoj membrani. Slika je preuzeta s interneta: [www.ib.bioninja.com.au](http://www.ib.bioninja.com.au).

koje je susreo po putu i za koje se vezao. Dakle, efektivni difuzijski koeficijent je smanjen u odnosu na početni slobodni difuzijski koeficijent zbog vezanja.

Osim tog efekta, koji zovemo *uhvat* ili eng. *trapping*, možemo mezoskopski prepoznati i efekt *gužve* ili eng. *crowdinga*: u slučaju velikog broja čestica u membrani, čestici je prostor kroz koji se može gibati pregrađen ili gibanje ometano. Ovaj efekt i njegov utjecaj na efektivni difuzijski koeficijent se ugrubo može razložiti na dvije argumentacije, a nije do kraja jasno koliko one opisuju dva različita efekta ili dva pristupa istome efektu.

S jedne strane, prostor dostupan za gibanje možemo promatrati kao da je pregrađen na poseban način: čestice iste ili različite vrste stvaraju „pregrade“ ili „hodnike“ („labyrinth“) kroz koji je ligandu dozvoljeno gibanje. Ograde ne moraju biti fiksne strukture, nego se u vremenu mogu mijenjati. Efekt takvog pregrađivanja je opet produljenje vremena gibanja od mjesta A do mjesta B jer čestica mora ići „okolnim“ putem.

S druge strane, možemo promatrati interakciju dviju zasebnih čestica i reći da gibanje čestice u proizvoljnom smjeru može biti spriječeno prisutnošću druge čestice, te prvotna čestica efektivno provodi više vremena na istome, početnom mjestu — kao da je vezana za neki skriveni receptor.

Skup svih nedostupnih položaja nekoj čestici u membrani u nekom trenutku možemo također nazvati izuzetim volumenom (eng. *excluded volume*) — čestica se efektivno giba u manjem prostoru od prvotno predviđenog. Ako promatramo kolektiv čestica njihova efektivna koncentracija raste, a s njom i frekvencija njihovih interakcija koje ometaju gibanje kako je prethodno opisano. Također, smanjenje difuzijskog koeficijenta možemo argumentirati promatranjem samo jedne čestice: točka B u koju čestica mora stići nekad se nađe u izuzetom volumenu pa se takve putanje ne mogu ostvariti, što nakon statističke manipulacije dovodi do smanjenja efektivnog difuzijskog koeficijenta.

Pojam izuzetog volumena nam koristi u teorijskom opisu nisko populiranih membrana gdje pozicija samih čestica koje izuzimaju prostor nije toliko bitna jer ne stvara kolektivno ponašanje poput pregrada. U svakom slučaju, efekt gužve efektivno smanjuje difuzijski koeficijent i to je u literaturi poznato [37–39].

Zajednička pojava obaju efekta u sustavu — uhvata i gužve — dovodi do drugačije ponašanja difuzijskoga koeficijenta, kao što je prezentirano u [1]. Hoće li efektivni difuzijski koeficijent rasti ili padati ovisi o tome koliki dio populacije liganada je imobiliziran vezivanjem i koliko je taj efekt uspio umanjiti efekt uhvata. Također treba uračunati i efekt gužve u membrani.

Fizički model koji će opisivati biološku difuziju treba uključiti membranu, ligande, receptore i njihove karakteristike — pojedinačnu intrinzičnu pokretljivost (slobodni difuzijski koeficijent) i karakteristične parametre vezivanja/odvezivanja para ligand/receptor. Iz modela želimo izračunati efektivni difuzijski koeficijent i njegovu ovisnost o molekulskom sastavu membrane, prvenstveno o koncentraciji receptora i liganada, ali i o parametrima vezivanja, tj. energiji vezivanja i intrinzičnoj pokretljivosti čestica u pitanju.

Mislav Cvitković i sur. u doktorskoj disertaciji [1] razmatrali su difuziju liganada na jednoj membrani uz prisustvo polja fiksiranih receptora na drugoj paralelno postavljenoj membrani. Takav postav membrani (slika 1.3) je prisutan u raznim biološkim situacijama, npr. pri adheziji imunskih stanica na endotel krvnih žila prilikom upale ili u rastu tumora u tijelu ili stanica u Petrijevoj zdjelici. Interakcije između dvije

zasebne stanice imunosnog sustava također pokazuju sličnu konfiguraciju membrana — „dodir“ između dvije membrane prenosi signal jednoj od stanica za proizvodnju različitih kemijskih tvari.

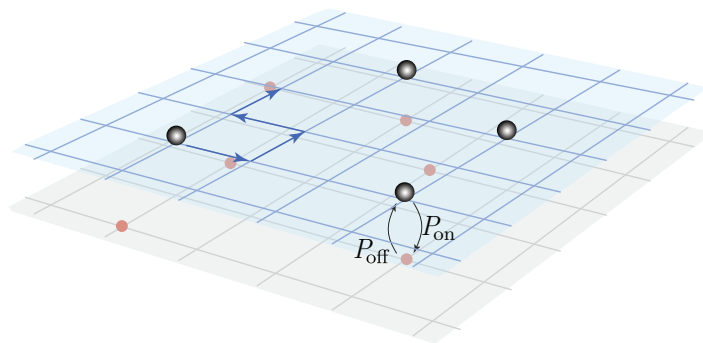
U ovom diplomskom radu zadržan je takav postav membrana prvenstveno zbog lakšeg manipuliranja koda za računalne simulacije, ali i da bi se efekt gužve, tj. *crowdinga*, odnosio samo na čestice iste vrste, a korelaciju između gibanja čestica na tim dvijema membranama bi unosio samo efekt uhvata, tj. *trappinga*. Ono što je različito u ovom radu u odnosu na [1] je da su receptori na drugoj membrani pokretni i time sustav dobiva simetriju na zamjenu uloge receptora i liganada.

Međuigra efekata uhvata i gužve, činjenica da stanična mašinerija može regulirati koncentracije receptora i liganada na membrani, činjenica da je signalizacija putem difuzije na membrani jedan od glavnih staničnih procesa i da je difuzijski transport sveprisutan u stanici, ne samo na membranama nego i u citoplazmi i u izvanstaničnom okolišu stanice, čini ovaj problem i zanimljivim i bitnim biofizičkim problemom.

## 1.4 Postavljanje problema

Od interesa su nam dvije paralelno postavljene membrane. Po jednoj difundiraju ligandi, a po drugoj receptori. Ligandi i receptori se mogu povezati ako su jedan ispod drugog i taj kompleks dalje ne može difundirati ni po jednoj membrani već je usidren.

Takva situacija se npr. susreće pri adheziji leukocita na endotel krvnih žila [40]. Adhezija leukocita na endotel je jedan korak u procesu dijapedeze kojom leukociti prelaze iz krvne struje u tkivo. Na leukocitnoj membrani se nalaze E-selektini (ligandi), a na endotelnoj membrani adresini (receptori) čijim vezivanjem se upalna stanica —



Slika 1.3: Shematski prikaz postava membrani korišten u [1] i ovome diplomskom radu. Crne točke predstavljaju ligande smještene na gornjoj membrani, a crvene receptore smještene na zasebnoj donjoj membrani. Slika je preuzeta iz [1].

leukocit — veže za mjesto na stijenci krvne žile gdje pokušava prodrijeti u tkivo.

Ligandi odnosno receptori se po praznoj membrani gibaju svojim slobodnim odnosno intrinzičnim difuzijskim koeficijentima  $D_O^L$ , odnosno  $D_0^R$ . Parametri vezivanja liganda i receptora su vjerojatnost vezivanja  $P_{on}$  i vjerojatnost odvezivanja  $P_{off}$ . Liganada odnosno receptora može biti na membranama u različitim koncentracijama označenim sa  $c_L$ , odnosno  $c_R$ .

Problem ovog diplomskog rada je odrediti udjele vezanih stanja u populacijama i efektivne difuzijske koeficijente  $D_{eff}^L$  liganada i  $D_{eff}^R$  receptora koji su reskalirani u odnosu na početne slobodne difuzijske koeficijente  $D_O^L$  i  $D_0^R$ . Pitanje je kako gore navedni parametri sustava ( $D_O^L$ ,  $D_0^R$ ,  $P_{on}$ ,  $P_{off}$ ,  $c_L$  i  $c_R$ ) utječu na reskaliranje, da li jedan izraz može pokriti reskaliranje u svim situacijama i da li se mogu identificirati neki mezoskopski efekti koji jasno doprinose reskaliranju.

Metoda koju smo odabrali za proučavanje difuzije po dvodimenzijskoj površini je računalna simulacija u kombinaciji s analitičkim proračunima fizičkih veličina od interesa, prvenstveno udjela vezanih stanja u populacijama, kasnije definiranog kao  $\langle c_B \rangle$ , i efektivnog difuzijskog koeficijenta,  $D_{eff}$ . Prema tome, naš interes je zapravo opisati simulirano gibanje čestica po membrani. Simulacija je detaljnije opisana u poglavlju 3.

Kroz cijeli diplomski rad sve pojave i ovisnosti se opisuju iz perspektive liganada zato jer postoji samo konceptualna razlika između liganada i receptora te zauzimanjem takvog pristupa analizi prepolavljamo posao. Poznavanje sustava iz perspektive receptora nam ne govori ništa novo, tj. svi izrazi i zaključci se lako obrnu i iskažu iz perspektive receptora.

## 2 Teorijska podloga

U ovome poglavlju bit će izložena teorija [1] koja se bavi modeliranjem efektivnih difuzijskih koeficijenata liganada u polju fiksiranih receptora, kako je već opisano u potpoglavlju 1.3. Razmotrit ćemo kako se ta teorija uklapa u trenutni problem gdje su i ligandi i receptori mobilni, koje su moguće popravke i o čemu ovisi uspješnost istih.

### 2.1 Difuzijski koeficijent liganada bez prisutnosti receptora

Prije nego pristupimo problemu ukupnog efekta gužve i uhvata, razmotrit ćemo difuziju liganada u polju liganada na dvodimenzijskoj rešetci budući da je to nulta aproksimacija difuzijskog koeficijenta u prisutnosti receptora.

Kao što je komentirano ranije u potpoglavlju 1.3, prisutnost jedinki iste vrste će smanjivati difuzijski koeficijent zbog steričkih smetnji. Kako bismo taj efekt modelirali poći ćemo od Chapman-Kolmogorovljeve jednadžbe (1.21) za  $P(\mathbf{r}, t)$ , gustoću vjerojatnosti nalaženja čestica na zadanoj točki i procijeniti utjecaj gužve na smanjenje difuzijskog koeficijenta kako je to učinjeno u [1]. Raspodjela koraka za ovaj slučaj iznosi

$$\Phi(\Delta) = p(c_L) \sum_{\alpha=\pm\mathbf{i}, \pm\mathbf{j}} \delta(\Delta - \mathbf{e}_\alpha) + (1 - p(c_L))\delta(\Delta), \quad (2.1)$$

gdje je  $p$  vjerojatnost skoka proizvoljne čestice na bilo koji od četiri susjedna čvora unutar jednog koraka. Primjetimo da  $p$  nije 1, kako bi bilo u membrani s malom koncentracijom liganada. Prema tome:

$$P(\mathbf{r}, t) = \int P(\mathbf{r} - \Delta, t - \tau) \Phi(\Delta) d\Delta, \quad (2.2)$$

odakle Taylorovim razvojem dobivamo:

$$\frac{\partial P(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = pD_0 \nabla^2 P(\mathbf{r}, t) \longrightarrow D_{\text{cr}} = D_0 p(c_L), \quad (2.3)$$

pri čemu se  $p(c_L)$  može izračunati samosuglasnom jednadžbom:

$$p = 1 - \sum_{\alpha} P_{\alpha}, \quad (2.4)$$

gdje  $P_{\alpha}$  označava vjerojatnost događaja  $\alpha$  koji ne dovodi do skoka.

Do skoka neće doći u tri slučaja. Prvi je da je mjesto na koje je čestica odabrala

skočiti zauzeto. Vjerojatnost takvog događaja je  $c_L$ . Drugi slučaj je da je mjesto na koje čestica planira skočiti *istovremeno* tom skoku zauzeto skokom čestice sa susjednog čvora. Vjerojatnost toga događaja je  $c_L \times 3 \times \frac{p(c_L)}{4}$ . Treći slučaj je da je mjesto na koje čestica planira skočiti *istovremeno* zauzeto nekom česticom, potom oslobođeno i opet zauzeto nekom trećom česticom. Vjerojatnost takvog događaja je  $c_L \times 3 \times \frac{p(c_L)}{4} \times c_L \times 2 \times \frac{p(c_L)}{4}$ . Taj bismo niz mogli nastaviti daljnjim složenijim realizacijama događaja koji uključuju još dalje susjede, no ovdje se zadržavamo na razini utjecaja prvih susjeda.

Prema tome,

$$p = 1 - c_L - \frac{3}{4}c_L p - \frac{3}{8}c_L^2 p^2, \quad (2.5)$$

odakle:

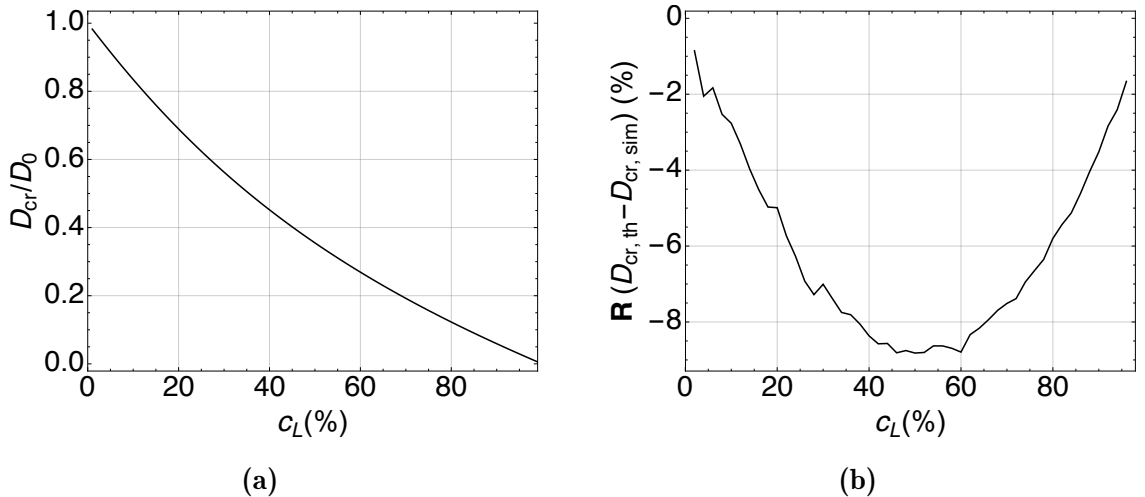
$$p_{\pm}(c_L) = \frac{1}{3c_L^2} \left( -3c_L - 4 \pm \sqrt{16 + 3c_L(8 + c_L(11 - 8c_L))} \right), \quad (2.6)$$

tj. za difuzijski koeficijent (2.3):

$$D_{cr}(c_L) = \frac{D_0}{3c_L^2} \left( \sqrt{16 + 3c_L(8 + c_L(11 - 8c_L))} - 3c_L - 4 \right). \quad (2.7)$$

Negativni predznak u  $p_{\pm}(c_L)$  je odbačen jer nema fizičkog smisla budući da bi davao negativnu vjerojatnost.

Vjerojatnost skoka  $p(c_L) = D_{cr}/D_0$  prikazana je na slici 2.1(a), a relativna greška



Slika 2.1: **(a)** Normirani efektivni difuzijski koeficijent liganda tj. vjerojatnost skoka na susjednu poziciju u ovisnosti o koncentraciji liganada na istoj rešetci, prema jednadžbi (2.7) **(b)** Prikaz relativne greške analitičke procjene difuzijskog koeficijenta  $D_{cr}$  pomoću jednadžbe (2.7) u odnosu na difuzijske koeficijente izračunate iz računalnih simulacija. Relativna greška je definirana sa (2.8). Slika je preuzeta iz [1]. Difuzija u obe slike je difuzija liganada po rešetci bez utjecaja receptora.

teorije u odnosu na simulacije,

$$\mathbf{R}(D_{\text{cr,th}}, D_{\text{cr,sim}}) = \frac{D_{\text{cr,th}} - D_{\text{cr,sim}}}{D_{\text{cr,sim}}}, \quad (2.8)$$

prikazana je na slici 2.1**(b)** i pokazuje vrlo dobro slaganje teorije i eksperimenta za cijeli parametarski prostor. Posebno je značajan pad relativne greške na velikim koncentracijama, što potvrđuje ispravnost aproksimacije prvih susjeda. Apsolutni predznak relativne greške je ostavljen da bi bilo jasno precjenjuje li teorija ili podcjenjuje efektivni difuzijski koeficijent.

## 2.2 Difuzijski koeficijent liganada u prisutnosti receptora

### 2.2.1 Prvi pokušaji modeliranja efektivnog difuzijskog koeficijenta

Dodavanje receptora u sustav se prvo očituje vezanjem određenog broja liganada,  $N_B$ , na receptor. Taj će broj u vremenu rasti, da bi se nakon određenog vremena uspostavio neki ravnotežni broj vezanih liganada/receptora,  $\langle N_B \rangle$ , odnosno prosječna koncentracija vezanih stanja,  $\langle c_B \rangle$ . Za ligande i receptore to znači da razlikujemo nepokretnu vezanu populaciju liganada i nevezanu populaciju liganada koja difundira difuzijskim koeficijentom  $D_{\text{cr}}$ .

Za populaciju pokretnih (nevezanih) liganada će vrijediti  $MSD(t) = 4D_{\text{cr}}t$ . Kako nevezana stanja liganada čine udio u populaciji liganada od  $1 - \langle c_B \rangle / c_L$ , tada će se kolektivni difuzijski koeficijent skalirati s tim udjelom:

$$D_{\text{eff}}^* = D_{\text{cr}}(c_L) \left( 1 - \frac{\langle c_B \rangle}{c_L} \right). \quad (2.9)$$

U izvodu  $D_{\text{cr}}$  svi su se ligandi mogli gibati. U ovom slučaju neki ne mogu pa možemo pokušati uračunati to koristeći efektivnu koncentraciju slobodnih liganada  $c'_L$ .

$$c'_L = \frac{N_L - N_B}{N_g - N_B} = \frac{c_L - \langle c_B \rangle}{1 - \langle c_B \rangle} \leq c_L \quad (2.10)$$

Tu novu koncentraciju koristimo za izračun  $D_{\text{cr}}(c'_L)$  i ta korekcija je ekvivalentna prepoznavanju izuzetog volumena u sustavu. Izuzeti volumen u ovom slučaju su čvorovi na kojima se nalaze vezani ligandi. Prema tome, za efektivni difuzijski koeficijent se

dobiva:

$$D_{\text{eff}}^{**} = D_{\text{cr}} \left( \frac{c_L - \langle c_B \rangle}{1 - \langle c_B \rangle} \right) \left( 1 - \frac{\langle c_B \rangle}{c_L} \right) \quad (2.11)$$

Usporedbom simulacija s teorijskim predviđanjima jednadžbi (2.9) i (2.11) vidjeli smo da jednažba (2.11) daje lošije slaganje od jednadžbe (2.9). Zbog toga u daljnim potpoglavljima ne uvodimo korekciju izuzetog volumena za  $D_{\text{cr}}$ .

U oba pristupa zanemarivali smo činjenicu da postoji dinamika izmjene liganada u vezanom stanju s onima u nevezanom. To je glavna novost u pristupima slijedećih potpoglavlja.

### 2.2.2 Fenomenološki izvod

U ovome pristupu modeliranju difuzije pratimo povijest svakog liganada kao izmjenu perioda boravka na receptorima i difundiranja po slobodnoj membrani [1]. Zato možemo reći da za difuziju liganada po rešetki efektivno vrijedi:

$$\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle = 4D_{\text{eff}}(\tau_{\text{on}} + \tau_{\text{off}}) \quad (2.12)$$

Ovdje  $\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle$  predstavlja prosječnu udaljenost između dva receptora s kojih se čestica odvezala i vezala sa sigurnošću od 100%,  $\tau_{\text{on}}$  je prosječno vrijeme potrebno da se ligand odveže s receptora, tj. vrijeme boravka na receptoru.  $\tau_{\text{off}}$  je prosječno vrijeme koje je potrebno da ligand prijeđe udaljenost do slijedećeg receptora na kojeg će se sigurno vezati. Koristeći prethodni rezultat možemo pisati  $\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle = 4D_{\text{cr}}(c_L)\tau_{\text{off}}$ .

Kao što smo definirali,  $\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle$  prikazuje prosječnu udaljenost između dva receptora — polazišnog i onog sigurnog odredišta. Ako je vjerojatnost vezanja liganda za receptor  $P_{\text{on}}$ , tada će samo  $P_{\text{on}}c_R$  biti moguća odredišta sa sigurnim vezivanjem. Također, neki su receptori već zauzeti i nisu raspoloživi za daljnje vezivanje. Pretpostavimo li da se s vremenom razvije stacionarna slika, možemo tu koncentraciju vezanih čestica označiti s  $\langle c_B \rangle$ . Prema tome slijedi dodatna korekcija broja receptora koji nas se tiču u gornjoj jednadžbi:  $c_{R,\text{eff}} = P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)$ .

Iz efektivne koncentracije receptora lako nalazimo prosječnu efektivnu difuzijsku udaljenost:

$$\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle = \frac{a_0^2}{c_{R,\text{eff}}} = \frac{a_0^2}{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}. \quad (2.13)$$

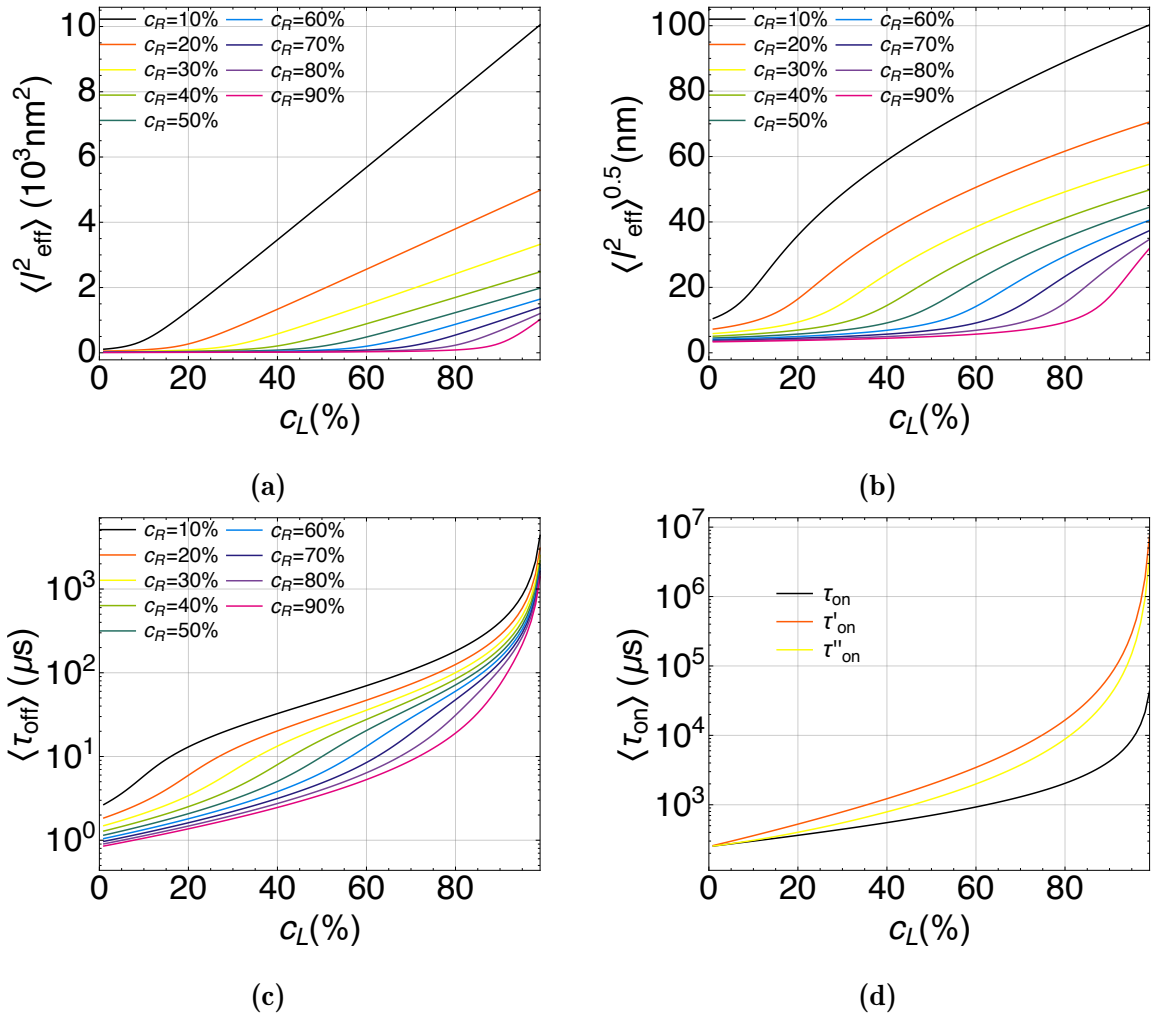


Iz (2.13) imamo za  $\tau_{\text{off}}$ :

$$\tau_{\text{off}} = \frac{1}{4D_{\text{cr}}} \frac{a_0^2}{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}. \quad (2.14)$$

Te krivulje su prikazane za različite koncentracije liganada i receptora na slici 2.2(a), 2.2(b) i 2.2(c). Izraz za  $\langle c_B \rangle$  korišten pri dobivanju tih grafova izveden je u potpoglavlju 2.3.

Na slikama se vidi da je u visokopopuliranim rešetkama  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$  manji za veće koncentracije receptora rešetke te raste za veće koncentracije liganada rešetke što je očekivano jer je s većim  $c_L$  manji udio slobodnih receptora, pa je veća njihova pro-



Slika 2.2: Grafički prikazi ovisnosti veličina prepoznatih kao bitnih u modeliranju difuzije o koncentraciji liganada na rešetki. **(a)** Kvadrat udaljenosti dva najbliža nevezana receptora:  $\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle = a_0^2 / (P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle))$  **(b)** Udaljenost između dva najbliža nevezana receptora:  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle} = a_0 / \sqrt{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}$  **(c)** Prosječno vrijeme koje ligand provede u difuziji između dva vezana stanja:  $\tau_{\text{off}} = \sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle} / 4D_{\text{cr}}(c_L)$  **(d)** Prosječno vrijeme koje ligand provede u vezanom stanju prema različitim izrazima:  $\tau_{\text{on}}$  (2.18),  $\tau'_{\text{on}}$  (2.20) i  $\tau''_{\text{on}}$  (2.21)

sječna udaljenost. Za primjetiti je da ovisnost  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$  o  $c_L$  ulazi indirektno kroz  $c_B$ , a ovisnost o  $c_R$  i direktno i indirektno.

Dok su relacije (2.13) i (2.14) primjenjene u [1] za nepomične receptore, pitanje ovog rada je koliko činjenica da su receptori mobilni utječe na udaljenost  $\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle$  kako je ona definirana u jednadžbi (2.13). Pretpostavka je da je to relativno dobra aproksimacija. Općenito, udaljenost koju ligand prijeđe do slijedećeg vezivanja može biti drugačija:

- ako se ligand veže opet na isti receptor;
- ako na putu do najbližeg receptora najbliži receptor postane zauzet ili se oslobodi bliži receptor koji je prethodno bio nedostupan;
- ako na putu do najbližeg receptora ciljani receptor oddifundira i neki drugi receptor postane bliži, koji je prethodno bio dalji;
- ako u difuzijsko područje liganda uđe novi receptor, pa udaljenost koju ligand prijeđe do vezivanja bude kraća od očekivane prema jednadžbi (2.13).

Prve dvije stavke tiču se i teorije stacionarnih i mobilnih receptora, a druge dvije su karakteristične za slučaj mobilnih receptora. Točnost pretpostavke (2.13) se u svakom slučaju može provjeriti detaljnom analizom trajektorija, što nije učinjeno u ovom diplomskom radu.

Preostaje nam definirati  $\tau_{\text{on}}$ , tj. prosječno vrijeme potrebno da se ligand odveže s receptora, tj. ono koje provede vezan za receptor. Receptor će se odvezati u karakterističnom prosječnom vremenu od  $\tau/P_{\text{off}}$ , gdje je  $\tau$  vrijeme računalnog koraka definirano s  $D_0$  i  $a_0$ . To je i intuitivno jer ako je vjerojatnost odvezivanja 100%, u svakom koraku će doći do odvezivanja. Proporcionalno smanjenju te vjerojatnosti produžuje se prosječno vrijeme potrebno da dođe do odvezivanja.

Međutim, to vrijeme nije ono koje nama treba. Moramo se osigurati da se ligand ne veže ponovo za isti receptor. Dovoljno je dobra aproksimacija ako tražimo da ligand i receptor oddifundiraju dalje na razmak od dva koraka. Mikroskopski se to može realizirati na više načina. Jedan je da se ligand odmakne za dva koraka od receptora. Tada će te dvije čestice biti udaljene najmanje za dva koraka i puno će vjerojatnije reagirati s nekom drugom jedinkom nego međusobno. Vjerojatnost takvog događaja je  $P_{\text{off}} \times p(c_L) \times p(c_L)$ . Ostali događaji koji mogu doprinjeti uspješnom rastavljanju para

su da se ligand pomakne u jednom smjeru, a receptor u drugome što ih opet dovodi na razmak od dva koraka. Vjerojatnost tog događaja je  $P_{\text{off}} \times p(c_L) \times p(c_R)$ .

Koji događaj će definirati  $\tau_{\text{on}}$ ? U slučaju velike koncentracije receptora vjerojatnije je da će se ligand pomaknuti sam za dva koraka nego da će tome doprinjeti receptor, tako da je u tom režimu bolje koristiti  $P_{\text{off}} \times p^2(c_L)$ .

U konačnici se za efektivni difuzijski koeficijent dobiva iz (2.12) i (2.14):

$$D_{\text{eff}} = \frac{a_0^2}{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)} \frac{1}{4} \left( \tau_{\text{on}} + \frac{1}{4D_{\text{cr}}} \frac{a_0^2}{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)} \right)^{-1} \quad (2.15)$$

$$= D_{\text{cr}} \left( \frac{D_{\text{cr}} \tau_{\text{on}} P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{D_0 \tau} + 1 \right)^{-1} \quad (2.16)$$

$$= D_{\text{cr}} \left( 1 + p(c_L) \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{\tau / \tau_{\text{on}}} \right)^{-1} \quad (2.17)$$

gdje smo koristili  $a_0^2 = 4D_0\tau$ . Ako iskoristimo posljednji rezultat za  $\tau_{\text{on}}$ :

$$\tau / \tau_{\text{on}} = P_{\text{off}} p^2(c_L), \quad (2.18)$$

slijedi:

$$\boxed{D_{\text{eff}} = D_{\text{cr}}(c_L) \left( 1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}} p(c_L)} \right)^{-1}}. \quad (2.19)$$

Na  $\tau_{\text{on}}$  se može gledati i na drugi način — to je jednostavno korektivni faktor kojim pokušavamo smanjiti difuzijski koeficijent za više koncentracije liganada. Kao što je prikazano u poglavlju 4, upravo u tome režimu slaganje simulacija s teorijom nije dovoljno dobro. Pri velikim  $c_L$ , imamo povećane  $\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle$  i  $\tau_{\text{off}}$ , kako je vidljivo na slici 2.2. U tako sporim difuzijama velika je vjerojatnost inače manje vjerojatnih događaja koji su opisani u prethodno navedenoj 2. , 3. , i 4. točki na stranici 19. Zbog toga bi trebalo posebno smanjiti difuzijske koeficijente u tom režimu, ako već nemamo predložen mehanizam kojim bismo uračunali te dodatne efekte. Logičan odabir za tu svrhu je  $p(c_L)$  jer je  $\sim 0$  za velike  $c_L$ .

Prema tome kao prvu korekciju možemo predložiti:

$$\tau / \tau'_{\text{on}} = P_{\text{off}} p^3(c_L). \quad (2.20)$$

i

$$\begin{aligned}\tau/\tau''_{\text{on}} &= P_{\text{off}} \left( p \cdot p^2 + (1-p) \cdot p^3 \right) \\ &= P_{\text{off}} p(c_L) \left( 2p^2(c_L) - p^3(c_L) \right),\end{aligned}\quad (2.21)$$

gdje se kombiniraju izrazi (2.18) i (2.20) ovisno o koncentraciji liganada. Pri malim  $c_L$  ( $p(c_L) \rightarrow 1$ ) prevagnut će izraz (2.18), a pri većim  $c_L$  ( $(1-p(c_L)) \rightarrow 1$ ) izraz (2.20). Vremena boravka na receptorima koja su dosad predložena prikazana su na slici 2.2(d).

Izrazi (2.20) i (2.21) daju svoja predviđanja za efektivne difuzijske koeficijente:

$$D'_{\text{eff}} = D_{\text{cr}}(c_L) \left( 1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}} p^2(c_L)} \right)^{-1}, \quad (2.22)$$

$$D''_{\text{eff}} = D_{\text{cr}}(c_L) \left( 1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}} (2p^2(c_L) - p^3(c_L))} \right)^{-1}. \quad (2.23)$$

### 2.2.3 Izvod pomoću master jednadžbe

U prethodnom potpoglavlju izvod je krenuo od razmatranja difuzije liganada kao niza boravaka na receptorima i putovanja između vezanja na receptore. Takav pristup je intuitivan, ali nije potkrijepljen *ab initio*. Radi toga provodimo izvod koristeći opet Chapman-Kolmogorovljevu master jednadžbu [1].

Definirat ćemo  $P_L(\mathbf{r}, t)$  i  $P_{\text{RL}}(\mathbf{r}, t)$  kao vjerojatnosti da čestica bude nevezana odnosno vezana na položaju  $\mathbf{r}$  u trenutku  $t$ . Zajedno  $P_L(\mathbf{r}, t)$  i  $P_{\text{RL}}(\mathbf{r}, t)$  čine  $P(\mathbf{r}, t)$ , vjerojatnost pronalaska čestice liganda na položaju  $\mathbf{r}$  u trenutku  $t$ . Jednadžba od koje krećemo je ista prethodnoj Chapman-Kolmogorovljevoj jednadžbi (2.2) uz iznimku da  $P(\mathbf{r}, t) \rightarrow P(\mathbf{r}, t + \tau)$ . Uz Taylorov razvoj po  $\tau$  dobivamo:

$$\frac{\partial P(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = + \left( \sum_{\alpha=\pm\mathbf{i}, \pm\mathbf{j}} \frac{\gamma}{4} P(\mathbf{r} - \mathbf{e}_\alpha, t) \right) - \gamma P(\mathbf{r}, t), \quad (2.24)$$

gdje je  $\gamma = p(c_L)/\tau$  frekvencija skakanja prosječne čestice, a indeksi u sumi označavaju sve smjerove odakle čestice mogu skočiti na položaj  $\mathbf{r}$ .

Vjerojatnost  $P(\mathbf{r}, t)$  je očuvana tako da se vezivanjem liganada događa prijenos određene količine vjerojatnosti iz  $P_L(\mathbf{r}, t)$  u  $P_{\text{RL}}(\mathbf{r}, t)$ , ili u slučaju odvezivanja obrnuto.

To možemo matematički zapisati kao:

$$\frac{\partial P_L(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = \frac{\gamma}{4} \sum_{\alpha=\pm i, \pm j} (P_L(\mathbf{r} - \mathbf{e}_\alpha, t) - P_L(\mathbf{r}, t)) - k_{\text{on}} P_L(\mathbf{r}, t) + k_{\text{off}} P_{\text{RL}}(\mathbf{r}, t) \quad (2.25)$$

$$\frac{\partial P_{\text{RL}}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = k_{\text{on}} P_L(\mathbf{r}, t) - k_{\text{off}} P_{\text{RL}}(\mathbf{r}, t), \quad (2.26)$$

gdje  $k_{\text{off}}$  i  $k_{\text{on}}$  predstavljaju brzine prijenosa vjerojatnosti iz jednog stanja u drugo stanje. Naša je pretpostavka da te brzine u prosjeku ne ovise o lokalnoj situaciji, tj. o vjerojatnostima  $P_R(\mathbf{r}, t)$ ,  $P_L(\mathbf{r}, t)$  i  $P_{\text{RL}}(\mathbf{r}, t)$ . Zbog toga ne postoji vezanje između jednačbi za raspodjelu vjerojatnosti liganada i receptora.

Imamo i jednačbu za raspodjelu vjerojatnosti slobodnih receptora  $P_R(\mathbf{r}, t)$  koja je ekvivalentna jednačbi (2.25):

$$\frac{\partial P_R(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = \frac{\gamma}{4} \sum_{\alpha=\pm i, \pm j} (P_R(\mathbf{r} - \mathbf{e}_\alpha, t) - P_R(\mathbf{r}, t)) - k_{\text{on}} P_R(\mathbf{r}, t) + k_{\text{off}} P_{\text{RL}}(\mathbf{r}, t). \quad (2.27)$$

Njeno rješenje ćemo dobiti analogijom iz rješenja za (2.25), a sada nastavljamo rješavati samo sustav (2.25)-(2.26).

Da bismo riješili ovaj sustav jednačbi, prebacujemo ih u Fourierov prostor i tamo ih rješavamo kao algebarske jednačbe. Prebacivanjem u Fourierov prostor dobivamo već spomenute dinamičke strukturne faktore  $S_L(\mathbf{k}, \omega)$  i  $S_{\text{RL}}(\mathbf{k}, \omega)$ .

$$-i\omega S_L - \frac{P_{L,0}(\mathbf{k})}{\pi} = \frac{\gamma}{4} \sum_{\alpha=\pm i, \pm j} (e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{e}_\alpha} - 1) S_L - k_{\text{on}} S_L + k_{\text{off}} S_{\text{RL}}, \quad (2.28)$$

$$-i\omega S_{\text{RL}} - \frac{(P_{\text{RL},0}(\mathbf{k}))}{\pi} = k_{\text{on}} S_L - k_{\text{off}} S_{\text{RL}}. \quad (2.29)$$

Početni uvjet sustava je već prije korišten:  $P(\mathbf{r}, t=0) = \delta(\mathbf{r})$ . U Fourierovom prostoru:

$$P(\mathbf{k}, t=0) = P_0(\mathbf{k}) = \int e^{-i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} \delta(\mathbf{r}) d^2\mathbf{r} = 1 = P_{L,0}(\mathbf{k}) + P_{\text{RL},0}(\mathbf{k}). \quad (2.30)$$

Raspodjela između vjerojatnosti u početnom trenutku jednaka je omjeru brzina prijenosa vjerojatnosti jer su one proporcionalne vjerojatnostima da je čestica vezana ili nevezana. Prema tome imamo uz (2.30):

$$\frac{P_{L,0}(\mathbf{k})}{P_{\text{RL},0}(\mathbf{k})} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \rightarrow P_{L,0}(\mathbf{k}) = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}}, \quad P_{\text{RL},0}(\mathbf{k}) = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}}. \quad (2.31)$$

Uz pokrate:

$$\Pi(\mathbf{k}) = \frac{1}{4} \sum_{\alpha=\pm\mathbf{i},\pm\mathbf{j}} e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{e}_\alpha} = \frac{1}{2} \sum_{\alpha=\mathbf{i},\mathbf{j}} \cos(\mathbf{k}\cdot\mathbf{e}_\alpha) = \frac{1}{2} \sum_{\alpha=\mathbf{i},\mathbf{j}} \cos(k_\alpha a_0), \quad (2.32)$$

$$\Sigma(\mathbf{k}) = \gamma(\Pi(\mathbf{k}) - 1) \quad (2.33)$$

sustav (2.28)-(2.29) možemo zapisati u slijedećem matričnom obliku:

$$\begin{pmatrix} -i\omega - \Sigma(\mathbf{k}) + k_{\text{on}} & -k_{\text{off}} \\ -k_{\text{on}} & -i\omega + k_{\text{off}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_L \\ S_{RL} \end{pmatrix} = \frac{1}{\pi} \begin{pmatrix} P_{L,0}(\mathbf{k}) \\ P_{RL,0}(\mathbf{k}) \end{pmatrix} = \frac{1}{\pi} \begin{pmatrix} \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}} \\ \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}} \end{pmatrix}. \quad (2.34)$$

Rješenja sustava su:

$$\pi S_L = \frac{\frac{i\omega k_{\text{on}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}} - k_{\text{off}}}{\omega^2 + i\omega(k_{\text{off}} + k_{\text{on}} - \Sigma(\mathbf{k})) + k_{\text{off}}\Sigma(\mathbf{k})}, \quad (2.35)$$

$$\pi S_{RL} = -\frac{1}{i\omega} + \left(1 + \frac{\Sigma(\mathbf{k})}{i\omega}\right) S_L, \quad (2.36)$$

odakle možemo dobiti:

$$S(\mathbf{k}, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{i\omega - k_{\text{off}} - k_{\text{on}} + \frac{k_{\text{off}}\Sigma(\mathbf{k})}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}}}{\omega^2 + i\omega(k_{\text{off}} + k_{\text{on}} - \Sigma(\mathbf{k})) + k_{\text{off}}\Sigma(\mathbf{k})}, \quad (2.37)$$

$$\Re(S) = \frac{-\frac{\Sigma(\mathbf{k})}{\pi} \left( \frac{k_{\text{on}}\omega^2}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}} + k_{\text{off}} \left( k_{\text{off}} + k_{\text{on}} - \frac{k_{\text{off}}\Sigma(\mathbf{k})}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}} \right) \right)}{\omega^4 + \omega^2 \left( (k_{\text{off}} + k_{\text{on}})^2 - 2k_{\text{on}}\Sigma(\mathbf{k}) + \Sigma^2(\mathbf{k}) \right) + k_{\text{off}}^2 \Sigma^2(\mathbf{k})}. \quad (2.38)$$

Inverznim Fourierovim transformatom od  $S$  možemo dobiti  $P$ , ali ono što nas zanima, difuzijski koeficijent  $D$ , možemo dobiti limesom prema izrazu (1.26). Stoga:

$$\lim_{\mathbf{k} \rightarrow 0} \Sigma(\mathbf{k}) = -\frac{a_0^2 \gamma}{4} \mathbf{k}^2 \quad (2.39)$$

$$\lim_{\mathbf{k} \rightarrow 0} \pi \frac{\omega^2}{\mathbf{k}^2} \Re(S(\mathbf{k}, \omega)) = \frac{a_0^2 \gamma}{4} \frac{\frac{k_{\text{on}}\omega^2}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}} + k_{\text{off}}(k_{\text{off}} + k_{\text{on}})}{\omega^2 + (k_{\text{off}} + k_{\text{on}})^2} \quad (2.40)$$

$$\begin{aligned} D_{\text{eff}} &= \lim_{\omega \rightarrow 0} \left( \lim_{\mathbf{k} \rightarrow 0} \pi \frac{\omega^2}{\mathbf{k}^2} \Re(S(\mathbf{k}, \omega)) \right) = \frac{a_0^2 \gamma}{4} \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}} \\ &= D_{\text{cr}}(c_L) \left( 1 + \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \right)^{-1} \end{aligned} \quad (2.41)$$

Opet se postavlja pitanje što znače  $k_{\text{on}}$  i  $k_{\text{off}}$ ? Obje brzine su proporcionalne vjerojatnosti događaja koje predstavljaju — za vezivanje možemo reći da je vjerojatnost  $(c_R - \langle c_B \rangle) \times P_{\text{on}}$ : vjerojatnost postojanja receptora  $\times$  vjerojatnost realizacije prilike.

Za odvezivanje, vjerojatnost iznosi  $P_{\text{off}} \times p(c_L)$ : vjerojatnost odvezivanja  $\times$  vjerojatnost skoka liganda u nekom smjeru. Zahtjevom da ligand dodatno skoči opet pokušavamo osigurati da se taj ligand neće vratiti na svoj stari receptor. Prema tome, za difuzijski koeficijent dobivamo očekivano:

$$D_{\text{eff}} = D_{\text{cr}}(c_L) \left( 1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}} p(c_L)} \right)^{-1}.$$

Još jedan zanimljiv prijedlog za  $k_{\text{off}}$  koji je logičan u ovom kontekstu je  $P_{\text{off}} \times \langle c_B \rangle / \tau$ . Naime, ako integriramo član  $k_{\text{on}} P_L(\mathbf{r}, t)$  iz (2.25) po prostoru dobiti ćemo prosječan ukupan broj vezivanja koji će se dogoditi na čitavoj rešetci u tome koraku. Za slučaj odvezivanja, ukupan broj odvezivanja na rešetci u koraku je  $P_{\text{off}} \langle N_B \rangle$ , što nam daje retrogradno  $k_{\text{off}} = P_{\text{off}} \langle c_B \rangle / \tau$ . Time ne probiremo ona odvezivanja koja rezultiraju prelazenjem udaljenosti  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$ , ali u *ab initio* pristupu ne bi ni trebali zauzimati takve mjere. Ovakav par  $k_{\text{on}}$  i  $k_{\text{off}}$  daje za efektivni difuzijski koeficijent:

$$D_{\text{eff}}^\dagger = D_{\text{cr}}(c_L) \left( 1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}} \langle c_B \rangle} \right)^{-1}. \quad (2.42)$$

Ako promotrimo sustav liganada i receptora mikroskopski, možemo zapisati detaljniju mikroskopsku master jednadžbu. Detaljnija je u tome što precizno prati algoritam prema kojem vršimo simulaciju čestičnog gibanja. Mikroskopska master jednadžba je nužno diskretizirana i vremenski i prostorno, te se tek uzimanjem limesa (u kontinualnoj granici koja daje točan slobodni difuzijski koeficijent  $D_0$ ) dobiva prava diferencijalna jednadžba. Zato je intuitivnije koristiti drugačije oznake gdje vjerojatnosti zamjenjujemo prosječnim koncentracijama. Kao u prethodnom mezoskopskom pristupu razlikujemo nevezana stanja i vezana stanja, ali ovaj put imamo i dvije dodatne jednadžbe za distribuciju vjerojatnosti receptora. Oznake  $\langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle$  i  $\langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle$  su oznake za prosječnu koncentraciju nevezanih liganada tj. receptora na čvoru  $\mathbf{v}$  u vremenskom koraku  $n$ . Slično imamo  $\langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle$  i  $\langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle$  za vezana stanja. Također, vrijedi  $\langle c_n(\mathbf{v}) \rangle = \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle + \langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle$  i ekvivalentno za receptore.

Ako vjerojatnost prelaska čestice s čvora  $\mathbf{v}$  na čvor  $\mathbf{v}'$  u trenutku  $n = t/\tau$  označimo s

$$T_n^{\text{L/R}}(\mathbf{v} \rightarrow \mathbf{v}') = \frac{1}{4} \left( 1 - \langle c_n^{\text{L/R}}(\mathbf{v}') \rangle \right), \quad (2.43)$$

gdje L i R indeks odabiremo za ligande odnosno receptore, mikroskopske master jed-

nadžbe za ligande su:

$$\begin{aligned}
\langle c_{n+1}^u(\mathbf{v}) \rangle - \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle &= - \sum_{\mathbf{v}'} T_n^L(\mathbf{v} \rightarrow \mathbf{v}') \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle \\
&\quad - \left( 1 - \sum_{\mathbf{v}'} T_n^L(\mathbf{v} \rightarrow \mathbf{v}') \right) \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle P_{\text{on}} \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle \\
&\quad + P_{\text{off}} \langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle \\
&\quad + T_n^L(\mathbf{v}' \rightarrow \mathbf{v}) (1 - P_{\text{on}} \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle) \sum_{\mathbf{v}'} \langle c_n^u(\mathbf{v}') \rangle, \quad (2.44)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\langle c_{n+1}^b(\mathbf{v}) \rangle - \langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle &= - P_{\text{off}} \langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle \\
&\quad + \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle \left( 1 - \sum_{\mathbf{v}'} T_n^L(\mathbf{v} \rightarrow \mathbf{v}') \right) P_{\text{on}} \langle c_n^u(\mathbf{v}') \rangle \\
&\quad + \sum_{\mathbf{v}'} \langle c_n^u(\mathbf{v}') \rangle T_n^L(\mathbf{v}' \rightarrow \mathbf{v}) P_{\text{on}} \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle. \quad (2.45)
\end{aligned}$$

Jednadžbe (2.44) i (2.45) su dobivene promatrajući sve moguće događaje koji mogu dovesti do promjene prosječne koncentracije nevezanih odnosno vezanih liganada na čvoru  $\mathbf{v}$  u koraku  $n$  na  $n + 1$ . U jednadžbi (2.44), u prvome retku dan je gubitak koncentracije odlaskom liganda na susjedni čvor  $\mathbf{v}'$ . U drugome retku gubitak koncentracije vezivanjem na receptor. Pretpostavka je da te čestice nisu oddifundirale u prvoj difuzijskoj fazi algoritma. U trećem retku dan je dobitak na koncentraciji odvezivanjem i konačno u četvrtom retku dan je dobitak koncentracije dolaskom novih nevezanih stanja na dani čvor  $\mathbf{v}$ . Pretpostavka je tome da se te čestice nisu vezale nakon što su došle na ciljani čvor  $\mathbf{v}$  u drugoj reakcijskoj fazi algoritma. Slično u jednadžbi (2.45): prvi redak predstavlja gubitak prosječne koncentracije vezanih stanja odvezivanjem liganda s receptora, drugi redak je dobitak u koncentraciji vezivanjem pod pretpostavkom da ligandi nisu oddifundirali u prvoj difuzijskoj fazi algoritma, treći redak daje dobitak u koncentraciji difundiranjem u prvoj fazi algoritma s čvorova  $\{\mathbf{v}'\}$  na čvor  $\mathbf{v}$  i vezivanjem tih liganda u drugoj reakcijskoj fazi algoritma.

Za receptore su mikroskopske jednadžbe:

$$\begin{aligned}
\langle c_{n+1}^u(\mathbf{v}) \rangle - \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle &= - \sum_{\mathbf{v}'} T_n^R(\mathbf{v} \rightarrow \mathbf{v}') \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle \\
&\quad - \left( 1 - \sum_{\mathbf{v}'} T_n^R(\mathbf{v} \rightarrow \mathbf{v}') \right) \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle P_{\text{on}} \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle \\
&\quad + P_{\text{off}} \langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle
\end{aligned}$$



$$+ T_n^R(\mathbf{v}' \rightarrow \mathbf{v})(1 - P_{\text{on}} \langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle) \sum_{\mathbf{v}'} \langle c_n^u(\mathbf{v}') \rangle, \quad (2.46)$$

$$\langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle = \langle c_n^l(\mathbf{v}) \rangle, \quad (2.47)$$

čiji članovi su ekvivalentni gore opisanim članovima mikroskopskih jednadžbi za ligande.

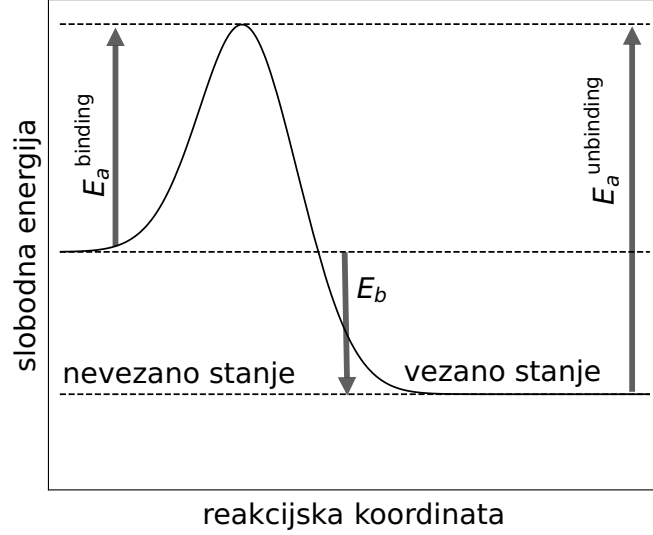
U ovom diplomskom radu takva master jednadžba nije rješavana zbog toga što smo pokušavali drugačijim — fenomenološkim — pristupom izvući kako se efekti uhvata i gužve očituju u difuziji. Kao što se vidi u master jednadžbama (2.25) i (2.26), već unaprijed modelirani  $D_{\text{cr}}$  se odmah uključio u opis preko koeficijenta  $\gamma$ . Rezultat takvog pristupa je dobivanje analitičkog izraza za  $D_{\text{eff}}$  i interpretacija u vidu difundiranja između boravaka na receptorima. Kad bismo riješili gornji sustav jednadžbi, vjerojatno bismo dobili samo numerička rješenja i konceptualno bismo iz toga teže zaključili nešto o sustavu. Numeričko-analitički pristup rješavanju ovakvih problema s nešto strožim uvjetima na izgled master jednadžbi proučen je u [41]. Korisno je pritom primjetiti da se vezivanje između gibanja liganada i receptora u jednadžbama pojavljuje u vidu članova oblika  $\langle c_n^u(\mathbf{v}) \rangle$  i  $\langle c_n^b(\mathbf{v}) \rangle$  u jednadžbama (2.44)-(2.45) i slično za jednadžbu (2.46) te da je lokalizirano (tj. ovisno o zauzeću specifičnog čvora), a ne difuzno kao u mezoskopskim master jednadžbama.

### 2.3 Statička termodinamička svojstva sustava

Kako bismo dobili ravnotežnu koncentraciju veza ligand-receptor  $\langle c_B \rangle$ , izračunat ćemo particijsku funkciju sustava. Pri svakom vezivanju para ligand-receptor dolazi do sniženja u energiji za energiju vezanja  $E_b$ . Ako  $N_g$  označava broj mjesta na rešetci,  $N_R$  broj receptora,  $N_L$  broj liganada,  $N_B$  broj liganada odnosno receptora koji će djeliti mjesto neovisno o tome jesu li vezani ili ne u zadanom mikrostanju, a  $n \leq N_B$  broj vezanih čestica u mikrostanju, za particijsku funkciju  $Z$  možemo pisati:

$$Z = \sum_{N_B=\min(N_L, N_R)}^{\min\{N_L, N_R\}} \binom{N_g}{N_R} \binom{N_g - N_R}{N_L - N_B} \binom{N_R}{N_B} \sum_{n=0}^{N_B} \binom{N_B}{n} \exp\left(-\frac{n\Delta E_b}{k_B T}\right) \quad (2.48)$$

Prvi binomni koeficijent označava odabir mjesta koje okupiraju receptori. Drugi binomni koeficijent označava broj načina na koje možemo rasporediti ligande koji ne dijele čvor s receptorom na  $N_g - N_R$  čvorova koji su im preostali. Treći binomni



Slika 2.3: Energetski reljef reakcije vezivanja/odvezivanja para ligand–receptor.

koeficijent označava broj načina na koji možemo rasporediti ligande koji dijele čvor s receptorom na  $N_R$  mogućih mjesta. Druga suma označava broj načina na koje možemo realizirati energetski to „mikrostanje“: može biti da nijedan od liganada koji dijele čvor s receptorom nije vezan ili da je neki broj  $n$  njih vezan. Prva suma označava iteraciju po  $N_B$  — od najmanje do najveće vrijednosti. Minimalna vrijednost  $N_B$  je nula ako je  $N_R + N_L \leq N_g$ . Ako je suma liganada i receptora veća od broja čvorova na rešetci uvijek će postojati minimalni broj preklapljenih liganada i receptora:  $N_L - (N_g - N_R)$ .

Također vrijedi:

$$\sum_{n=0}^{N_B} \binom{N_B}{n} \exp\left(-\frac{nE_b}{k_B T}\right) = \sum_{n=0}^{N_B} \binom{N_B}{n} \left(\frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}}\right)^n = (1 + \zeta)^{N_B}, \quad (2.49)$$

gdje smo uveli

$$\zeta = \frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}}. \quad (2.50)$$

Pritom je korišten Boltzmanov izraz:

$$\exp\left(-\frac{nE_b}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{n(E_a^{\text{unbinding}} - E_a^{\text{binding}})}{k_B T}\right) = \left(\frac{\exp\left(-\frac{E_a^{\text{unbinding}}}{k_B T}\right)}{\exp\left(-\frac{E_a^{\text{binding}}}{k_B T}\right)}\right)^n = \left(\frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}}\right)^n, \quad (2.51)$$

a  $E_a^{\text{binding}}$  i  $E_a^{\text{unbinding}}$  su definirani na slici 2.3. Raspišimo  $Z$  u slučaju  $N_L + N_R \leq N_g$ :

$$Z = \sum_{N_B=0}^{\min\{N_L, N_R\}} \frac{N_g!}{(N_L - N_B)!(N_g - N_R - N_L + N_B)!(N_R - N_B)!} \frac{(1 + \zeta)^{N_B}}{N_B!} \quad (2.52)$$

Koristeći se Pochhammerovim simbolima, definiranim kao

$$(a)_{n+1 \in \mathbb{N}} = a(a+1)\dots(a+n) = \frac{(a+n)!}{(a-1)!} \quad (2.53)$$

binomne koeficijente unutar sume možemo zamijeniti s:

$$Z = \frac{N_g!}{(N_R!N_L!(N_g - N_R - N_L)!)} \sum_{N_B=0}^{+\infty} \frac{(-N_L)_{N_B}(-N_R)_{N_B}}{(N_g - N_R - N_L + 1)_{N_B}} \frac{(1 + \zeta)^{N_B}}{N_B!}, \quad (2.54)$$

gdje smo koristili Pochhammerove zagrade na negativnim brojevima da bi  $N_B$  izvukli u indeks Pochhammerove zagrade. Pošto smo to učinili dva puta za isti Pochhammerov indeks, to nam je dopušteno. Ovako formirana suma je definicija hipergeometrijske funkcije  ${}_2F_1$ ,

$${}_2F_1 = \left( \begin{matrix} a & b \\ c \end{matrix} ; z \right) = \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{(a)_n(b)_n}{(c)_n} \frac{z^n}{n!} \quad (2.55)$$

U završnici, treba primjetiti da ako  $P_{\text{on}} = 1$ , svih će  $N_B$  liganada biti vezano pa to reducira unutarnju sumu na samo jedan član:

$$\sum_{n=0}^{N_B} \binom{N_B}{n} \exp\left(-\frac{nE_b}{k_B T}\right) \rightarrow \binom{N_B}{N_B} \exp\left(-\frac{N_B E_b}{k_B T}\right) = \left(\exp\left(-\frac{E_b}{k_B T}\right)\right)^{N_B} = \zeta^{N_B}, \quad (2.56)$$

Pa možemo pisati:

$$Z = \frac{N_g!}{N_R!N_L!(N_g - N_R - N_L)!} {}_2F_1 \left( \begin{matrix} -N_L & -N_R \\ N_g - N_R - N_L + 1 \end{matrix} ; 1 - \delta_{P_{\text{on}},1} + \frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}} \right). \quad (2.57)$$

U slučaju  $N_L + N_R > N_g$  dobivamo sličnim postupkom:

$$Z = \frac{\left(1 - \delta_{P_{\text{on}},1} + \frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}}\right)^{N_R + N_L - N_g} N_g!}{(N_R + N_L - N_g)!(N_g - N_L)!(N_g - N_R)!} {}_2F_1 \left( \begin{matrix} N_L - N_g & N_R - N_g \\ N_R + N_L - N_g + 1 \end{matrix} ; 1 - \delta_{P_{\text{on}},1} + \frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}} \right). \quad (2.58)$$

Kako bismo izračunali  $\langle c_B \rangle = \langle N_B \rangle / N_g$  računamo:

$$\langle N_B \rangle = \frac{1}{Z} \sum_{N_B=\min(N_B)}^{\min(N_L, N_R)} \binom{N_g}{N_R} \binom{N_g - N_R}{N_L - N_B} \binom{N_R}{N_B} \sum_{n=0}^{N_B} \binom{N_B}{n} n \exp\left(-\frac{nE_b}{k_B T}\right) = \zeta \frac{d}{d\zeta} \ln(Z). \quad (2.59)$$

Za derivaciju hipergeometrijske funkcije imamo [42]:

$$\frac{d}{dz} {}_2F_1 \left( \begin{matrix} a & b \\ c \end{matrix}; z \right) = \frac{ab}{c} {}_2F_1 \left( \begin{matrix} a+1 & b+1 \\ c+1 \end{matrix}; z \right) \quad (2.60)$$

Odatle za slučaj  $N_L + N_R > N_g$  direktno imamo:

$$\langle N_B \rangle = \frac{\zeta(N_R + N_L - N_g)}{1 - \delta_{P_{on},1} + \zeta} + \frac{\zeta(N_L - N_g)(N_R - N_g)}{(1 + N_R + N_L - N_g)} \cdot \frac{{}_2F_1 \left( \begin{matrix} N_L - N_g + 1 & N_R - N_g + 1 \\ N_R + N_L - N_g + 2 \end{matrix}; 1 - \delta_{P_{on},1} + \zeta \right)}{{}_2F_1 \left( \begin{matrix} N_L - N_g & N_R - N_g \\ N_R + N_L - N_g + 1 \end{matrix}; 1 - \delta_{P_{on},1} + \zeta \right)} \quad (2.61)$$

i za slučaj  $N_L + N_R \leq N_g$ :

$$\langle N_B \rangle = \frac{\zeta N_L N_R}{(1 + N_g - N_L - N_R)} \frac{{}_2F_1 \left( \begin{matrix} 1 - N_L & 1 - N_R \\ N_g - N_R - N_L + 2 \end{matrix}; 1 - \delta_{P_{on},1} + \zeta \right)}{{}_2F_1 \left( \begin{matrix} -N_L & -N_R \\ N_g - N_R - N_L + 1 \end{matrix}; 1 - \delta_{P_{on},1} + \zeta \right)}. \quad (2.62)$$

Izračunavši  $\langle N_B \rangle$  odnosno  $\langle c_B \rangle = \langle N_B \rangle / N_g$ , u izrazu (2.19) više nemamo nepoznata, a efektivni difuzijski koeficijent je dan kao funkcija osnovnih parametara sustava,  $N_L$ ,  $N_R$ ,  $P_{on}$ ,  $P_{off}$ ,  $D_0$  i  $N_g$ . Isti ti parametri su i izravni parametri simulacija s kojima ćemo usporediti izvedene relacije za  $\langle c_B \rangle$  i  $D_{eff}$ .

## 3 Simulacije i obrada rezultata

### 3.1 Simulacije

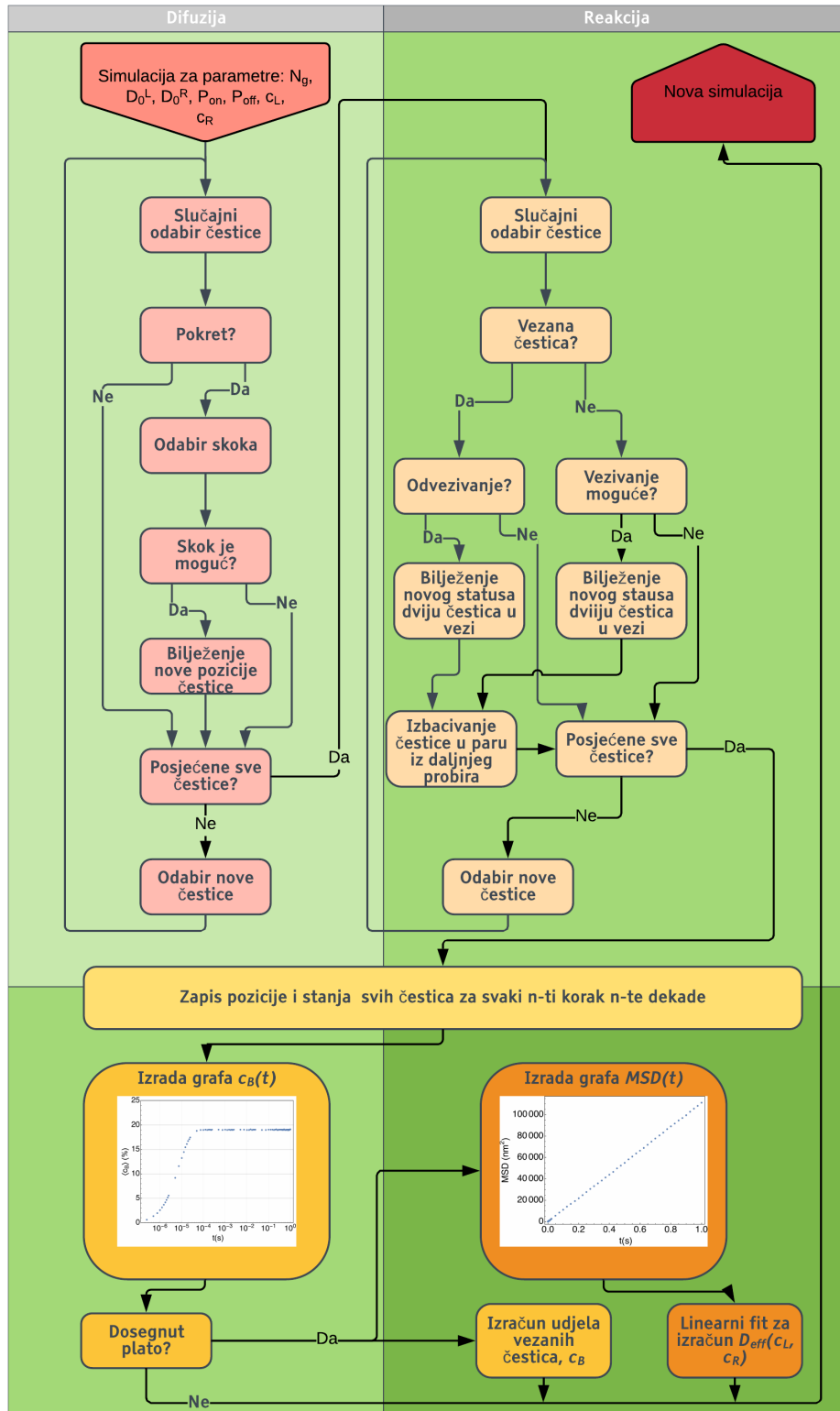
U simulaciji su membrane prikazane dvjema kvadratnim rešetkama dimenzija  $N_g = 256 \times 256$  po čijih  $N_g$  čvorova se mogu gibati čestice preskačući od jednog do susjednog čvora ako je čvor slobodan, tako da se po gornjoj gibaju ligandi, a po donjoj receptori. Rešetke su međusobno poravnate. Koncentracija liganada odnosno receptora na rešetci označena je sa  $c_L = N_L/N_g$  odnosno  $c_R = N_R/N_g$ , gdje su  $N_L$  i  $N_R$  ukupni brojevi liganada odnosno receptora u sustavu. Svaki tip čestice ima svoju intrinzičnu pokretljivost danu slobodnim difuzijskim koeficijentom  $D_0^L$  odnosno  $D_0^R$ . Stvaranje kompleksa ligand–receptor ako se ligand i receptor nađu na istom čvoru rešetke događa se s vjerojatnošću  $P_{\text{on}}$  u svakom koraku simulacije, dok raspad veze ima vjerojatnost  $P_{\text{off}}$ . Sa  $N_B$  je označen broj vezanih stanja i sa  $\langle c_B \rangle$  prosječna koncentracija vezanih stanja u rešetci,  $\langle c_B \rangle = N_B/N_g$ .

Simulacije su postavljene s periodičkim rubnim uvjetima: ako čestica oddifundira preko jednog od rubova rešetke, izići će na drugom suprotnom rubu rešetke. Čestice su na početku simulacije postavljene u čvorove rešetke slučajnim odabirom. To vrijedi i za ligande i za receptore. Situacija se na rešetki obnavlja u koracima koji odgovaraju fiksnom vremenskom intervalu  $\tau$ .

Česticama je dozvoljeno gibanje u smjerovima lijevo, desno, gore i dolje. U svakom koraku svaka čestica ulazi u proces odabira skoka. Skok na već zauzeto mjesto nije dozvoljen i ako slučajno za česticu bude odabran skok upravo u smjeru u kojem je zauzeto mjesto, čestica ostaje na svome mjestu. Skok u svim smjerovima je *a priori* jednako vjerojatan i osim u spomenutom slučaju da je skok spriječen prisutnošću druge čestice, čestica će sigurno učiniti skok.

U slučaju da čestica doskoči na čvor koji je točno iznad čvora druge (donje) rešetke na kojoj je receptor, postavlja se pitanje hoće li čestica biti vezana ili ne. Zato se u sustavu definiraju dvije konstante (tj. vjerojatnosti),  $P_{\text{on}}$  i  $P_{\text{off}}$  — vjerojatnosti da se čestica veže ako je nevezana odnosno odveže ako je vezana.

Bitno je spomenuti da se u svakom vremenskom koraku sve čestice, i receptori i ligandi, stavljaju u listu koja se perturbira i potom se redom za svaku česticu, ovisno o njevoj situaciji, donose odluke. Algoritam je shematski prikazan na slici 3.1. Ako je čestica nevezani ligand, algoritam je odabrati smjer skoka, potom vidjeti je li taj skok



Slika 3.1: Shematski prikaz simulacije i obrade rezultata. Simulacije su vršene u tri serije kojim smo ispitivali različite dijelove parametarskog prostora. Prva serija je uključivala ovisnost  $D_{eff}$  o koncentracijama liganada i receptora u rešetci  $c_L, c_R$ , druga serija ovisnost  $D_{eff}$  o energiji vezanja  $E_b = k_B T \ln(P_{on}/P_{off})$  i treća ovisnost  $D_{eff}$  o relativnoj intrinzičnoj pokretljivosti liganada i receptora,  $D_0^L/D_0^R$ .

moću; ako je, skočiti, a ako nije, ostati na mjestu i prijeći na odluke sljedeće čestice. Nakon skokova treba vidjeti je li na mjestu na kojem je ligand prisutan i receptor; ako jest, odrediti hoće li doći do vezivanja te prijeći na odluke o vezivanju sljedeće čestice.

U simulaciji su nasumični procesi implementirani odabirom nasumičnog broja  $r \in \langle 0, 1 \rangle$ . Ako je potrebno odlučiti o skoku, onda ako je  $0 < r \leq 0.25$  čestica skače udesno, ako je  $0.25 < r \leq 0.5$  čestica skače ulijevo itd. Ako je potrebno odlučiti o vezivanju odnosno odvezivanju, ako je  $0 < r \leq P_{\text{on}}$ , doći će do vezivanja, inače ne. Slično je i za odvezivanje.

Simulacija je povezana sa stvarnim parametrima fizičkog sustava pomoću jednadžbe  $a_0^2 = 4D_0\tau$ , gdje je  $\tau$  vrijeme jednog simulacijskog koraka,  $D_0 = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  je intrinzični difuzijski koeficijent na rešetki bez drugih liganada i receptora, gdje je  $1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  tipična vrijednost difuzijskog koeficijenta u razrijeđenim biološkim sustavima [43], a  $a_0 = 1 \text{ nm}$ , što je tipični razmak između dviju molekula fosfolipida. Iz toga se lako izračuna da je  $\tau = 0.25 \mu\text{s}$ .

Sve simulacije su vršene na rešetki veličine  $256 \times 256$  jer je pokazano da je to dovoljno velika rešetka da se dobije stabilna statistika u čitavome parametarskom prostoru. Stabilna statistika se u nekim djelovima parametarskog prostora počinje pojavljivati već za  $N_g \geq 120 \times 120$ . Simulacija se odvijala u  $4 \cdot 10^6$  koraka kako bi ukupno simulacijsko vrijeme bilo 1 s. Do ekvilibriranja statističkih veličina bi dolazilo unutar nekoliko milisekundi.

Simulacije su vršene u tri serije u kojima smo ispitivali različite dijelove parametarskog prostora. Prvo nas je zanimalo kako efektivni difuzijski koeficijenti ovise o pokretljivosti receptora, tj. o intrinzičnom slobodnom difuzijskom koeficijentu receptorske vrste. Za fiksne  $P_{\text{on}} = 0.1$  i  $P_{\text{off}} = 0.001$  i šest različitih koncentracija  $\{c_L = 20\%, c_R = 30\%\}$ ;  $\{c_L = 30\%, c_R = 20\%\}$ ;  $\{c_L = 50\%, c_R = 60\%\}$ ;  $\{c_L = 60\%, c_R = 50\%\}$ ;  $\{c_L = 70\%, c_R = 80\%\}$  i  $\{c_L = 80\%, c_R = 70\%\}$  mjenjali smo omjere  $D_0^R/D_0^L$  od  $10^{-4}$  do  $10^4$ .

Drugo nas je zanimalo kako difuzija ovisi o energiji vezanja koja je definirana preko vjerojatnosti stvaranja para ligand/receptor  $P_{\text{on}}$  i vjerojatnosti raspada tog para  $P_{\text{off}}$ . Za konstantne koncentracije  $c_L = 30\%$  i  $c_R = 20\%$  i standardni odabir slobodnih difuzijskih koeficijenata mjenjali smo  $P_{\text{on}}/P_{\text{off}}$  od 0.001 do 1000.

U zadnjoj seriji simulacija smo mjenjali koncentracije liganada odnosno receptora na rešetki. Mjenjali smo  $c_L$  u koracima po 5% od 5% do 95% i  $c_R$  u koracima po 10% od

0% do 100%. Pritom smo fiksirali  $P_{\text{on}} = 0.1$  i  $P_{\text{off}} = 0.001$ , a postavili  $D_0 = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ .

Algoritam korišten za simulacije može direktno simulirati samo situacije kada se receptori gibaju „sporije“ od liganada, tj. kada je omjer  $(D_0^{\text{R}}/D_0^{\text{L}})^{-1}$  prirodan broj. Algoritam uzima u obzir manju intrinzičnu pokretljivost receptora u odnosu na ligande tako da je karakteristično vrijeme receptorske dinamike — koje se u ovom algoritmu vodi kao trajanje jednog simulacijskog koraka — bilo višekratnik karakterističnog vremena ligandne dinamike. U tome slučaju sve dok ne bi došao  $k$ -ti korak perturbacije liganada receptori bi mirovali i bilježile bi se njihove nepromjenjene pozicije u simulacijskom ispisu. Simulacije koje su zahtjevale da  $D_0^{\text{R}}/D_0^{\text{L}} > 1$ , tj. da se receptori gibaju brže od liganada vršili smo indirektno. Umjesto da pratimo gibanje liganada, pratili bi gibanje receptora čiju smo koncentraciju odabrali tako da bude željena koncentracija liganada, a koncentraciju liganada bismo postavili na željenu koncentraciju receptora.

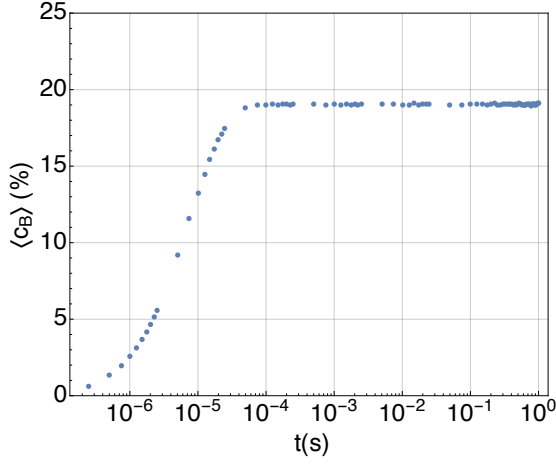
### 3.2 Obrada rezultata

Ono što je bilježeno iz svake simulacije za određeni niz parametara  $\{c_{\text{L}}, c_{\text{R}}, P_{\text{on}}, P_{\text{off}}, D_0^{\text{L}}, D_0^{\text{R}}\}$  je položaj svakog liganda kroz sve korake i njegovo stanje — vezano ili nevezano. Kasnije su ti podatci sustavno analizirani da bi se dobili  $N_{\text{B}}(t)$  i  $MSD(t)$ . MSD je dobiven sumirajući i uposjećavajući po ansamblu kvadrirane udaljenosti svih šetača od njihovih početnih pozicija za svaki pojedini trenutak. Iz toga je linearnom regresijom dobiven efektivni difuzijski koeficijent  $D_{\text{eff}}$ . Međurezultati dobiveni u jednoj reprezentativnoj simulaciji su prikazani na slici 3.2.

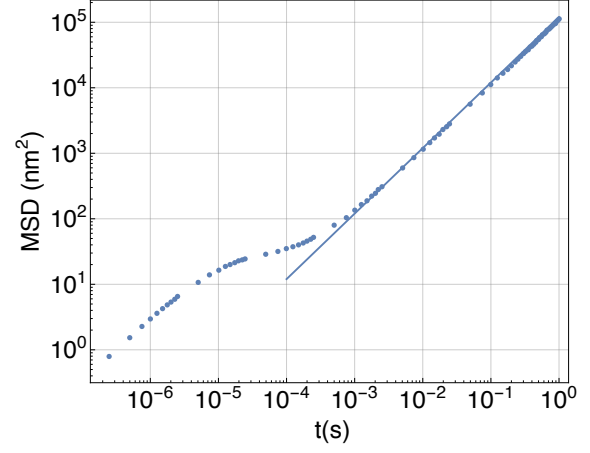
Za svaku simulaciju je provjeravano je li sustav u termodinamičkoj ravnoteži tako da je računalno pregledavano dostiže li se plato kao na slici 3.2(a). To znači da je sustav razvio i održava svoju prosječnu koncentraciju vezanih stanja, što je jedna od statičkih termodinamičkih veličina.

Simulacije su pokretane i rezultati sakupljeni pomoću `bash`-skripti koje su pokretale `Python`-skripte. Sam simulacijski kôd je pisan u `C++`-u u stilu OOP-a (Objektno orijentirano programiranje), te je pozivan iz `Python`-skripti. `.txt` datoteke s konačnim vrijednostima prosječnih koncentracija vezanih stanja i efektivnim difuzijskim koeficijentima potom su obrađivani u *Mathematici* [44]. *Mathematica* je korištena i za prikaz nekih teorijskih grafova i kasniju analizu.





(a) Koncentracija vezanih stanja u rešetci,  $\langle c_B \rangle$ .



(b) MSD(t), tj.  $\langle \Delta x^2 \rangle(t)$ .

Slika 3.2: Grafički prikazi međurezultata dobivenih iz simuliranih trajektorija. Obe koordinatne osi grafa (b) su logaritamski skalirane. Na grafu (b) povučena je intrapolicija čiji nagib odgovara reskaliranom efektivnom difuzijskom koeficijentu. Parametri simulacije:  $N_g = 256 \times 256$ ,  $D_0^R = D_0^L = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $P_{\text{on}} = 0.1$ ,  $P_{\text{off}} = 0.001$ ,  $c_L = 35\%$ ,  $c_R = 20\%$ ,  $\tau = 1 \times 10^{-6} \text{s}$ ,  $N = 4 \cdot 10^6$  koraka

## 4 Rezultati i rasprava

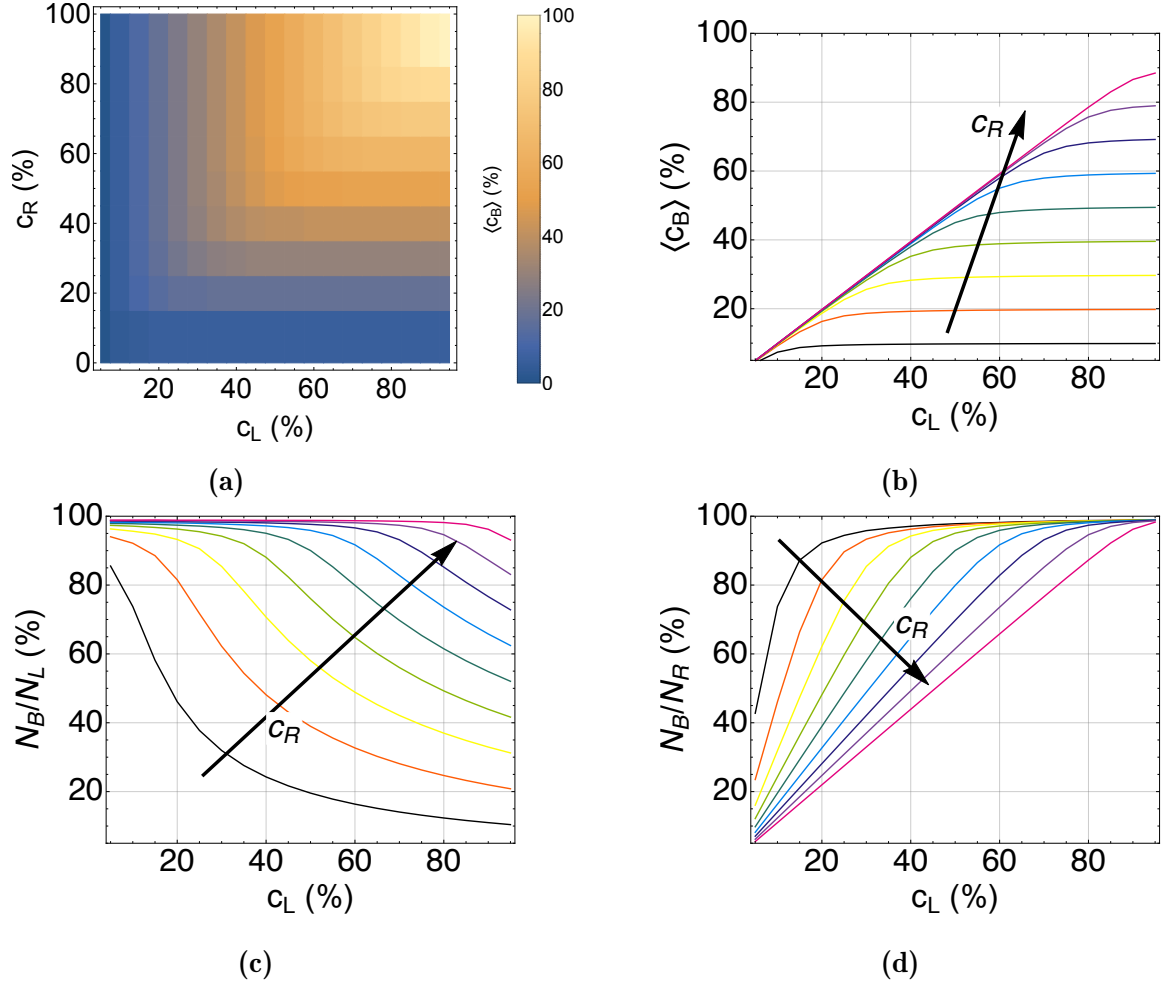
Iz tri serije simulacija koje smo pokretali za različite parametre u konačnici smo bilježili broj vezanih stanja i efektivni difuzijski koeficijent. U ovome poglavlju prikazati ćemo rezultate simulacija i usporediti ih s teorijskim predviđanjima iz poglavlja 2. Prvo ćemo proučiti je li izraz (2.61) za  $\langle c_B \rangle$  u skladu s rezultatima simulacija i kako se  $\langle c_B \rangle$  ponaša za različite koncentracije liganada i receptora u membrani. Potom ćemo proučiti kako intrinzična pokretljivost i energija vezanja utječu na efektivni difuzijski koeficijent i naposljetku, kako efektivni difuzijski koeficijent ovisi o svojim glavnim parametrima,  $c_L$  i  $c_R$ .

Difuzijski koeficijent je bio bilježen za ligande i za receptore posebno, ali zbog simetričnosti sustava na ulogu receptora i liganada bit će dovoljno analizirati rezultate samo za difuzijski koeficijent liganada.

### 4.1 Ovisnost broja vezanih stanja o koncentracijama liganada i receptora

Simulacije su pokretane za potpun raspon koncentracija liganada i receptora. U svim simulacijama intrinzična pokretljivost liganada i receptora je bila istovjetna  $D_0 = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , a omjer  $P_{\text{on}}/P_{\text{off}} = 100$ , takav da sustav preferira vezano stanje. Na slici 4.1 su pregledno prikazani rezultati simulacija za broj vezanih stanja izražen kao udio u ukupnom broju čvorova rešetke  $N_g$ , kao udio u ukupnom broju liganada  $N_L$  i kao udio u ukupnom broju receptora  $N_R$ .

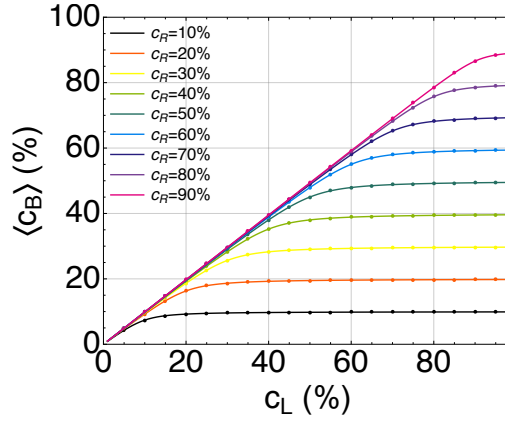
Na konturnom grafu 4.1(a) za primjetiti je da je zrcalno simetričan oko identitete što je posljedica već komentirane zamjenjivosti uloga liganada i receptora. Na slici 4.1(b) vidi se da za zadani  $c_R$  postoji dio krivulje koji odgovara linearnom porastu  $\langle c_B \rangle \approx c_L$  dok je  $c_L \leq c_R$  te dio krivulje u platou,  $\langle c_B \rangle \approx c_R$ , za  $c_L > c_R$ . Takvo ponašanje je potpuno očekivano, uzevši u obzir da je vjerojatnost vezivanja 100 puta veća od vjerojatnosti odvezivanja. Na slici 4.1(c) i 4.1(d) se isto to vidi iz perspektive liganada, odnosno receptora. Za zadani  $c_R$ , porastom  $c_L$ , pada  $\langle N_B \rangle / N_L$  jer dolazi do zasićenja receptora. Što je  $c_R$  veći, do takvog zasićenja dolazi za veće  $c_L$  pa je unutar većeg raspona  $c_L$  stanje sustava takvo da je malo slobodnih liganada. Obratno, za zadani  $c_R$ , porastom  $c_L$  dolazi do rasta  $\langle N_B \rangle / N_R$  jer svi receptori postaju postupno okupirani. Taj efekt, istovremeno povećanje broja slobodnih liganada i smanjenje broja



Slika 4.1: Udjeli vezanih stanja **(a)** i **(b)**: u ukupnom broju čvorova rešetke; **(c)**: u ukupnom broju liganada; **(d)**: u ukupnom broju receptora, u ovisnosti o različitim koncentracijama čestica na rešetki. Graf **(a)** združeno prikazuje rezultate simulacija na konturnom grafu. Graf **(b)** se može shvatiti kao niz rezova konturnog grafa uzduž  $x$ -osi. Strelice na grafovima **(b)**, **(c)** i **(d)** pokazuju smjer porasta  $c_R$  od 10% do 90% u koracima od 10%. Simulacijski paramteri:  $D_0^R = D_0^L = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $P_{\text{on}} = 0.1$ ,  $P_{\text{off}} = 0.001$ ,  $\tau = 1 \times 10^{-6} \text{s}$ ,  $N = 4 \cdot 10^6$  koraka.

slobodnih receptora na grafovima 4.1(c) i 4.1(d), ima suprotstavljen utjecaj na difuziju liganada. Detaljnije o tome ćemo komentirati u raspravi o rezultatima za difuzijski koeficijent liganada u potpoglavlju 4.4.

Na slici 4.2 je prikazano slaganje simulacija s modelom za  $\langle c_B \rangle$  (2.61). Vidi se izvrsno slaganje simulacija i teorije za  $\langle c_B \rangle$ .



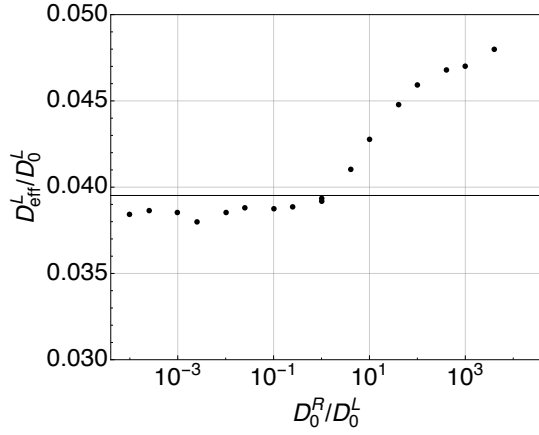
Slika 4.2: Usporedba simulacijskih rezultata i teorijske procjene udjela vezanih stanja prema izrazu (2.61). Simulacijski rezultati su prikazni točkama, a analitička procjena punim linijama.

## 4.2 Ovisnost difuzijskog koeficijenta o relativnoj pokretljivosti liganada i receptora

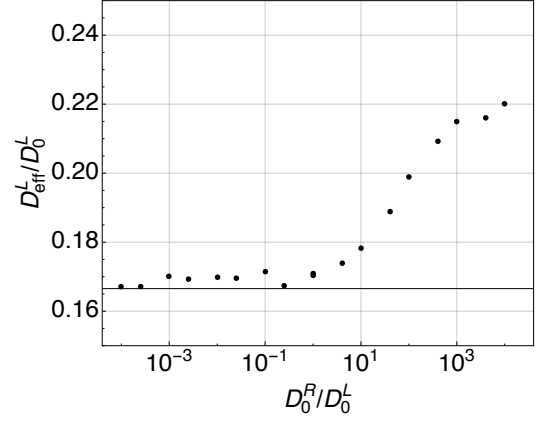
Simulirali smo šest parova koncentracijskih režima:  $\{c_L = 20\%, c_R = 30\%\}$ ;  $\{c_L = 30\%, c_R = 20\%\}$ ;  $\{c_L = 50\%, c_R = 60\%\}$ ;  $\{c_L = 60\%, c_R = 50\%\}$ ;  $\{c_L = 70\%, c_R = 80\%\}$ ;  $\{c_L = 80\%, c_R = 70\%\}$ . Rezultati simulacija su prikazani na slici 4.3. Na  $x$ -osi je naveden omjer slobodnih difuzijskih koeficijentata  $D_0^R/D_0^L$ . Na  $y$ -osi je korišten normirani efektivni difuzijski koeficijent liganada. Režim stacionarnih receptora kakav se susreće u [1] može se poistovjetiti rezultatima za  $D_0^R/D_0^L \ll 1$  tj. s lijevom stranom  $x$ -osi.

Na slici 4.3 vidi se da  $D_{\text{eff}}^L$  raste za svaki od analiziranih parova koncentracija: kada su receptori u suvišku (lijevi grafovi na slici 4.3), kada su ligandi u suvišku (desni grafovi na slici 4.3), kada su obje rešetke rijetko populirane (gornji grafovi na slici 4.3) ili kada su obje rešetke gusto populirane (donji grafovi na slici 4.3). Porast  $D_{\text{eff}}^L$  se javlja i u situaciji kad su receptori sporiji od liganada ( $D_0^R/D_0^L < 1$ ) ali je posebno zamjetan kada su brži ( $D_0^R/D_0^L < 1$ ). Ocjena efektivnog difuzijskog koeficijenta izrazom (2.19) drži u nisko populiranim rešetkama (graf (a) i (b)) za  $D_0^R/D_0^L < 1$ . U ostalim grafovima procjena efektivnog difuzijskog koeficijenta izrazom (2.19) predstavlja precjenjenje za  $D_0^R/D_0^L < 1$  i podcjenjenje za  $D_0^R/D_0^L > 1$ .

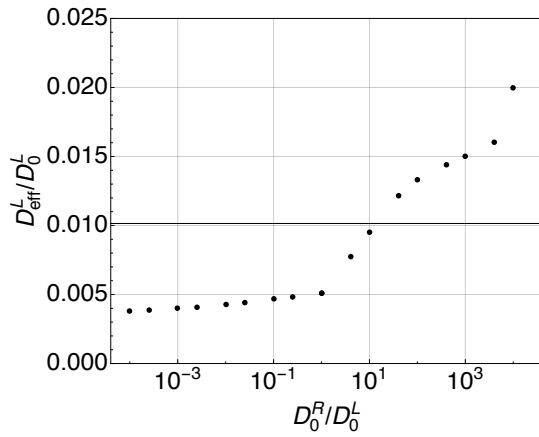
Do promjene difuzijskih koeficijenata vjerojatno dolazi zbog smanjene efektivne vjerojatnosti da se ligand i receptor nađu ili, vjerojatnije, zbog veće efektivne vjerojatnosti da se uspješno raziđu nakon što su se odvezali. Promjena efektivnih vjerojatnosti  $P_{\text{off}}^{\text{eff}}$  i  $P_{\text{on}}^{\text{eff}}$  dovodi do dužeg vremena  $\langle \tau_{\text{on}} \rangle$  i kraćeg vremena  $\langle \tau_{\text{off}} \rangle$ , posljedica čega bi bila



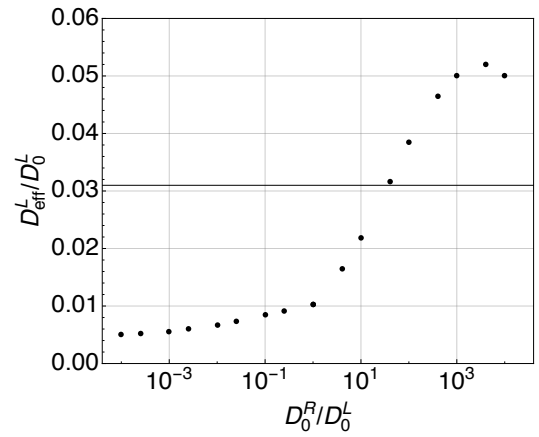
(a)  $c_L = 20\%$ ,  $c_R = 30\%$



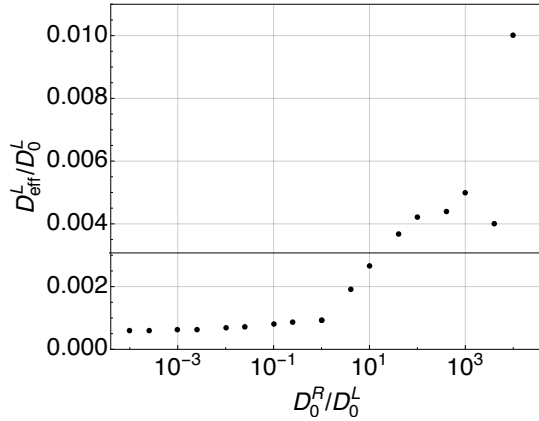
(b)  $c_L = 30\%$ ,  $c_R = 20\%$



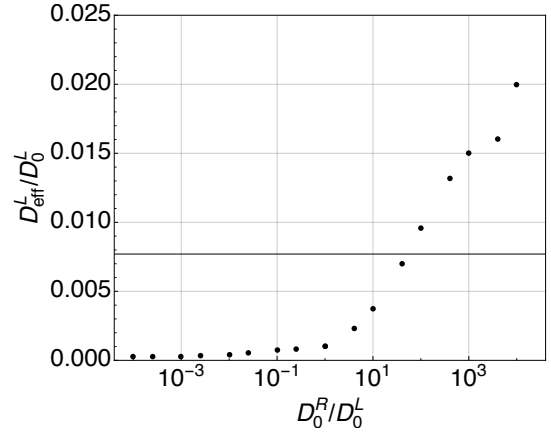
(c)  $c_L = 50\%$ ,  $c_R = 60\%$



(d)  $c_L = 60\%$ ,  $c_R = 50\%$



(e)  $c_L = 70\%$ ,  $c_R = 80\%$



(f)  $c_L = 80\%$ ,  $c_R = 70\%$

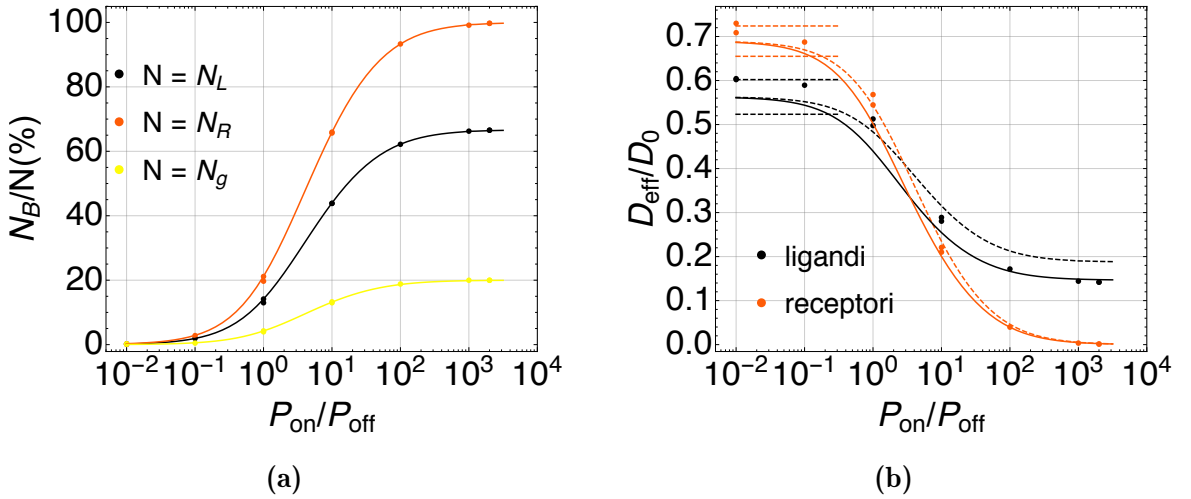
Slika 4.3: Rezultati simulacija za različite intrinzične pokretljivosti receptora u odnosu na pokretljivost liganada,  $D_0^R/D_0^L$ . Simulacije su pokrenute za šest različitih parova koncentracija liganada i receptora, kako je naznačeno ispod pojedinačnih grafova. Svaka točka je dobivena linearnom regresijom  $MSD(t)$  na pravac i greška u tome smislu je manja od promjera simbola. Simulacije nisu sustavno ponavljane za iste parametre. Pune linije predstavljaju analitičku procjenu efektivnog difuzijskog koeficijenta pomoću izraza (2.19). Simulacijski parametri:  $P_{on} = 0.1$ ,  $P_{off} = 0.001$ ,  $\tau = 1 \times 10^{-6}$  s,  $N = 4 \cdot 10^6$  koraka

povećanje efektivnog difuzijskog koeficijenta. Takva modifikacija *efektivnih* vjerojatnosti ne utječe na udio vezanih stanja jer on ovisi o  $\ln P_{\text{on}}/P_{\text{off}} \propto E_b$ , tj. o *intrinzičnim* vjerojatnostima vezivanja/odvezivanja.

### 4.3 Ovisnost difuzijskog koeficijenta o energiji vezanja liganada i receptora

U ovom potpoglavlju proučit ćemo kako dobro naši modeli opisuju simulacije za različite energije vezanja  $E_b$ . Također nas zanima je li za efektivni difuzijski koeficijent bitna samo energija vezanja  $E_b = k_B T \ln(P_{\text{on}}/P_{\text{off}})$ , ili su bitne i zasebne vjerojatnosti  $P_{\text{off}}$  i  $P_{\text{on}}$ . Za odabrani režim  $c_L = 30\%$  i  $c_R = 20\%$  pokrenuli smo simulacije za različite vrijednosti omjera  $P_{\text{on}}/P_{\text{off}}$ . Za neke omjere birali smo različite parove vjerojatnosti  $P_{\text{on}}$  i  $P_{\text{off}}$ . Rezultati su prikazani na slici 4.4.

Na slici 4.4(a) vidi se izvrsno slaganje teorije i simulacija. Simulacije koje su pokretane za isti  $E_b$ , ali različite parove  $P_{\text{on}}$  i  $P_{\text{off}}$  su dale vrlo slične rezultate, što demonstrira poznatu činjenicu da statička termodinamička veličina poput  $\langle c_B \rangle$  ovisi samo o  $E_b$ . S porastom energije vezanja udio vezanih stanja se približava teorijskom maksimumu, u



Slika 4.4: Rezultati simulacija i slaganje s teorijskom procjenom (a) za udio vezanih stanja u različitim populacijama te (b) za efektivni difuzijski koeficijent. Simulacijski rezultati su prikazani točkama, analitičke procjene punom linijom. Za neke omjere  $P_{\text{on}}/P_{\text{off}}$  simulacije su pokretane za različite kombinacije  $P_{\text{on}}$  i  $P_{\text{off}}$  koji odgovaraju istoj energiji vezanja. Na grafu (b) standardno predviđanje dano izrazom (2.19) dano je punom linijom. Iscrtkana linija se odnosi na procjenu danu izrazom  $D_{\text{eff}} = D_{\text{cr}}^*(c_L)(1 - \langle c_B \rangle / c_L)$ , (2.9). Vodoravne iscrtkane linije predstavljaju pogrešku za  $D_{\text{cr}}(c_L)$  izračunatu prema slici 2.1(b), preuzetoj iz [1]. Simulacijski parametri:  $2D_0^R = D_0^L = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $c_L = 30\%$ ,  $c_R = 20\%$ ,  $\tau = 1 \times 10^{-6} \text{s}$ ,  $N = 4 \cdot 10^6$  koraka.

ovom slučaju  $\langle c_B \rangle_{\max} = 20\%$ . Za negativne energije vezanja ( $P_{\text{on}}/P_{\text{off}} < 1$ ) gotovo da nema vezanih stanja.

Na slici 4.4**(b)** prikazani su simulacijski rezultati za efektivni difuzijski koeficijent i slaganje teorijskog modela sa simulacijama. Iz simulacija vidimo da efektivni difuzijski koeficijenti padaju s porastom  $E_b$ , što je posljedica jačanja efekta uhvata: ili se ligandi češće vežu za receptor ili manje često odvezuju s receptora. Za negativne energije vezanja efektivni difuzijski koeficijent receptora je veći od efektivnog difuzijskog koeficijenta liganada zbog toga što receptora ima 10% manje pa je efekt gužve manje izražen. Za visoke energije vezanja situacija je obrnuta: efektivni difuzijski koeficijent receptora je manji od efektivnog difuzijskog receptora za ligande. Uzrok tome je što je većina receptora tada vezana i nepokretna, a liganda koji su slobodni i doprinose  $MSD$ -u ima  $10\%N_g$ .

Teorijski modeli dani izrazima (2.19) (pune linije na slici 4.4) i (2.9) (iscrtkane linije na slici 4.4) relativno dobro predviđaju trendove, ali treba primijetiti da je ova serija simulacija izvedena samo za jedan par koncentracija ( $c_L$ ,  $c_R$ ) koji je u režimu kada teorijski modeli dobro opisuju sustav kako će biti prikazano kasnije u potpoglavlju 4.4. Izraz (2.19) (puna linija) pokazuje izvrsno slaganje za pozitivne  $E_b$  i podcjenjuje efektivni difuzijski koeficijent za negativne  $E_b$ . Izraz (2.9) (iscrtkana linija) pokazuje lošije slaganje sa simulacijama za pozitivne  $E_b$ , posebice za ligande. Za negativne  $E_b$ , slaganje je jednako loše kao s izrazom (2.19). Oba teorijska modela u režimu negativnih  $E_b$  se svode na  $D_{\text{cr}}$ , tako da neslaganje u tome režimu točno odgovara i iznosom i smjerom ranije komentiranoj grešci izraza (2.7) za  $D_{\text{cr}}$  (slika 2.1). Precjenjenje efektivnog difuzijskog koeficijenta izrazom (2.9) za pozitivne  $E_b$ , specifično za liganade, vjerojatno je rezultat toga što model ne računa izmjenu vezanih i nevezanih stanja, tj. pretpostavlja da jedan *specificirani* dio populacije miruje, a drugi doprinosi difuziji. To će biti detaljnije komentirano u potpoglavlju 4.4.

Simulacije koje smo pokretali za istu  $E_b$ , ali različite kombinacije vjerojatnosti  $P_{\text{off}}$  i  $P_{\text{on}}$ , ne pokazuju značajne razlike. Vjerojatno je da efektivni difuzijski koeficijent ovisi samo o energiji vezanja  $E_b$ , tj. o omjeru  $P_{\text{off}}/P_{\text{on}}$ , a ne o specifičnim vrijednostima  $P_{\text{on}}$  i  $P_{\text{off}}$ .

## 4.4 Ovisnost efektivnog difuzijskog koeficijenta o koncentracijama liganada i receptora

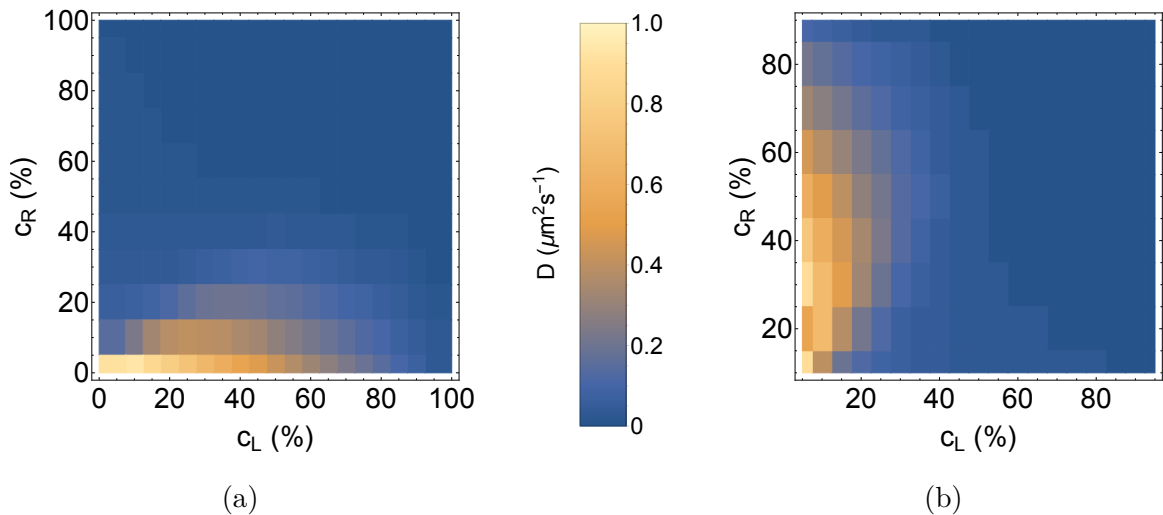
Glavno pitanje ovog diplomskog rada je kako različite koncentracije receptora i liganada na membrani utječu na reskaliranje efektivnog difuzijskog koeficijenta i da li činjenica da su receptori mobilni, što je razlika u odnosu na [1], ima utjecaja.

### 4.4.1 Prikaz rezultata simulacija

Na slici 4.5 s konturnim grafovima su prikazani efektivni difuzijski koeficijenti **(a)** liganada i **(b)** receptora. Opet se može primjetiti da su to uz zamjenu  $L \leftrightarrow R$  u biti dva potpuno ista grafa. Na grafovima se vidi svijetlije područje koje odgovara lokalnom maksimumu difuzijskog koeficijenta koji se jasno vidi u linijskim grafovima na slici 4.6.

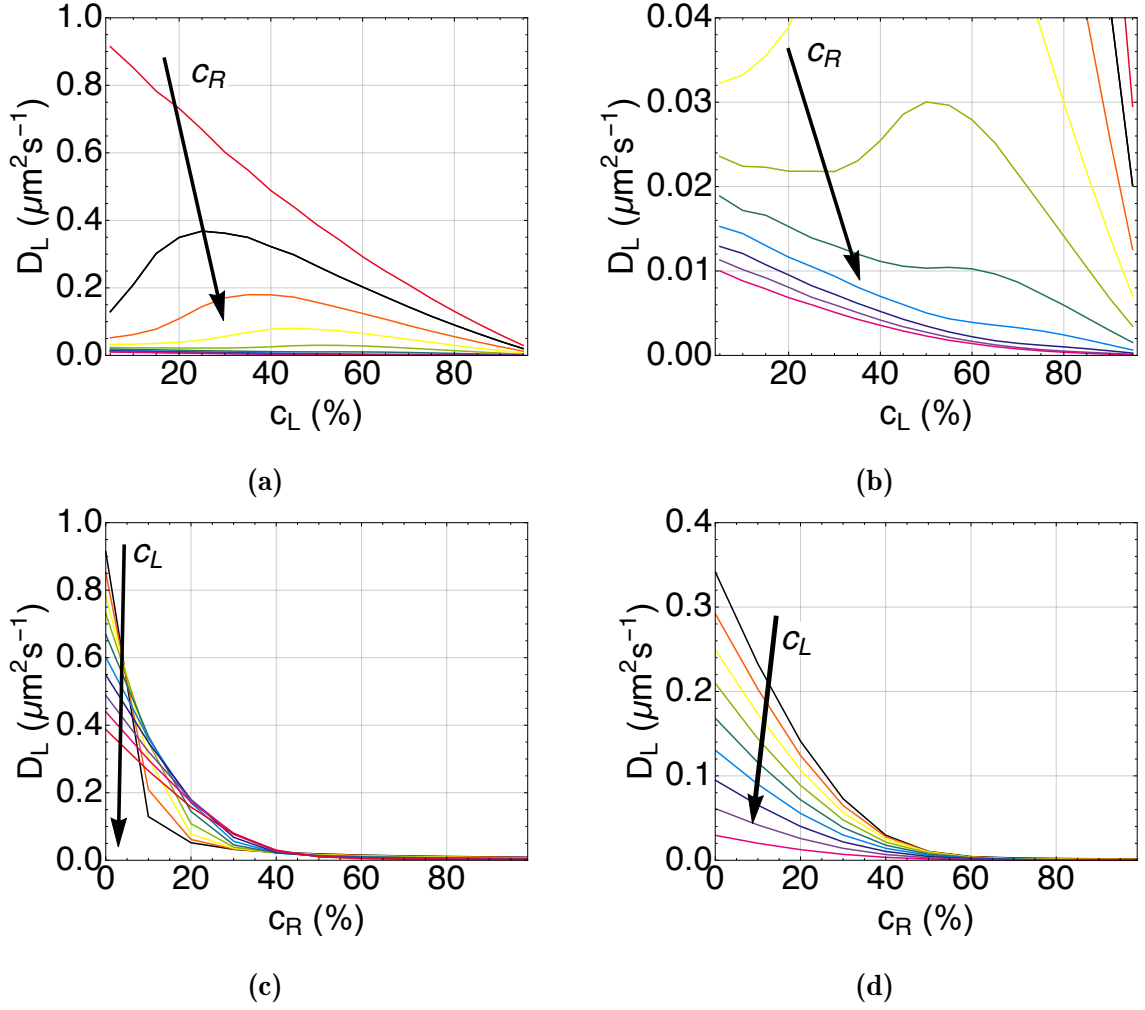
Linijski grafovi na slici 4.6 prikazuju rezultate simulacija za efektivni difuzijski koeficijent liganada,  $D_{\text{eff}}^L$  na dva načina: prateći porast  $c_L$  za zadani  $c_R$  (**(a)** i **(b)**) i obratno, prateći porast  $c_R$  za zadani  $c_L$  (**(c)** i **(d)**). Vrijednosti na ordinati su uvijek manje od  $1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} = D_0$ , tako da je difuzijski koeficijent liganada u svakom slučaju reduciran u odnosu na slobodni difuzijski koeficijent.

Efektivni difuzijski koeficijent pokazuje neočekivani trend pri porastu  $c_L$  (slike 4.6**(a)** i 4.6**(b)**) za koncentracije  $c_R$  od 10% do 50%: efektivni difuzijski koeficijent



Slika 4.5: Simulacijom dobiveni efektivni difuzijski koeficijenti  $D_{\text{eff}}$  za različite koncentracije liganada i receptora na rešetci. Graf **(a)** daje rezultate za difuzijski koeficijent *liganada*, a graf **(b)** za difuzijski koeficijent *receptora*. Za primjetiti je da su grafovi identični ako se uloge  $x$ -osi i  $y$ -osi zamjene. Simulacijski parametri:  $D_0^R = D_0^L = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $P_{\text{on}} = 0.1$ ,  $P_{\text{off}} = 0.001$ ,  $\tau = 1 \times 10^{-6} \text{s}$ ,  $N = 4 \cdot 10^6$  koraka.





Slika 4.6: Simulirani efektivni difuzijski koeficijent liganda  $D_{\text{eff,L}}$  u ovisnosti o koncentracijama liganada,  $c_L$ , i receptora,  $c_R$ , u rešetci. Simulacijski rezultati su zapravo pobliže prikazani rezultati sa slike 4.5(a), gdje na grafovima (a) i (b) imamo rezove uzduž  $x$ -osi, a na grafovima (c) i (d) uzduž  $y$ -osi. Graf (b) je uvećanje grafa (a) po  $y$ -osi. Strelice na oba grafa su pokazuju porast  $c_R$  od 0% do 90% u koracima od 10%. Na grafu (c) prikazane su ovisnosti za  $c_L$  od 5% do 50%, a na grafu (d) za  $c_L$  od 55% do 95%, u koracima od 5%. Simulacijski paramteri:  $D_0^R = D_0^L = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $P_{\text{on}} = 0.1$ ,  $P_{\text{off}} = 0.001$ ,  $\tau = 1 \times 10^{-6} \text{s}$ ,  $N = 4 \cdot 10^6$  koraka.

*raste* s porastom koncentracije liganada, što je protivno očekivanju da će zbog efekta gužve pri većoj koncentraciji efektivni difuzijski koeficijent biti manji. Taj efekt je izraženiji za manje koncentracije receptora i proteže se dok je  $c_L < c_R$ . Nakon toga efektivni difuzijski koeficijent počne padati i kolektivno teži u nulu, kako je i očekivano.

Na slici 4.6(c) i 4.6(d) vidi se da efektivni difuzijski koeficijent *liganada* za fiksni  $c_L$  uniformno pada s porastom  $c_R$ . To je sasvim očekivano ponašanje jer veći broj receptora daje više prilika za vezivanje i smanjuje  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$ , kakva god bila koncentracija liganada. Strmina tog spusta govori na drugi način o ranije komentiranom lokalnom maksimumu: na slici 4.6(c) vidi se da je za manje  $c_L$  spust strmiji nego za veće  $c_L$  te

se to očituje kao križanje trendova. Drugim riječima rečeno, dolazi do tog da za neki manji  $c_L$  imamo manji efektivni difuzijski koeficijent nego za neki veći  $c_L$  za fiksni  $c_R$ . To je upravo reformulirana izjava da porastom  $c_L$  raste efektivni difuzijski koeficijent.

Pojavu lokalnog maksimuma u grafu  $D_{\text{eff}}(c_L)$  može se objasniti suprotstavljenim efektima koje ima porast  $c_L$  na difuziju liganada. *S jedne strane* porastom  $c_L$  pojačava se efekt gužve i to otežava difuziju liganada. Efekt gužve ovisi o ukupnoj koncentraciji liganada  $c_L$  čijim porastom pada  $D_{\text{cr}}$ . *S druge strane* zbog fiksnog broja receptora,  $c_R \cdot N_g$ , povećavanjem  $c_L$  postepeno se smanjuje broj slobodnih, nevezanih receptora i smanjuje se efekt uhvata. Smanjen broj slobodnih receptora dovodi do porasta  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$ . Ligandi stoga dulje vremena provode nevezani i to povećava efektivni difuzijski koeficijent. Lokalni maksimum se pojavljuje u području gdje  $c_L \lesssim c_R$ , gdje je porast  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$  izražen (slika 2.2) te čestice provode više vremena u Brownovu gibanju po membrani, što rezultira povećanjem efektivnog difuzijskog vremena  $\langle \tau_{\text{off}} \rangle$  i povećanjem efektivnog difuzijskog koeficijenta.

Alternativno, na pojavu lokalnog maksimuma možemo gledati iz perspektive liganada: argument da je povećanjem koncentracije liganada manje slobodnih receptora ekvivalentan je argumentu da je povećanjem koncentracije liganada povećan broj slobodnih liganada (slika 4.1(c)) koji sad više doprinose povećanju kolektivnog  $MSD(t)$  sustava. Taj doprinos svakako ovisi o tome koliko su oni pokretljivi, tj. o  $D_{\text{cr}}(c_L)$  — o efektu gužve. Ti dopinosi su suprotstavljeni, pa o njihovim iznosima, koji su različiti za različite  $c_L$ , ovisi konačno ponašanje efektivnog difuzijskog koeficijenta.

Naglašenost lokalnih maksimuma progresivno pada s porastom  $c_R$ . Za veće koncentracije  $c_R$  smanjenje efekta uhvata vjerojatno manje povećava efektivni difuzijski koeficijent nego što ga efekt gužve smanjuje. To bi moglo biti posljedica toga što iako se smanji broj slobodnih receptora i dalje ih je mnogo u sustavu. Da bi došlo do efekta značajnog produženja  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$  treba biti mnogo liganada u sustavu, a tada je efekt gužve puno više izražen.

#### 4.4.2 Usporedba s teorijskim modelima

U diplomskom radu naveli smo nekoliko modela za efektivni difuzijski koeficijent. Pregledno su popisani u tablici 4.1.

Na slici 4.7 je prikazano slaganje simulacija s modelom za  $D_{\text{eff}}$  (2.19). Na slikama 4.7(a) i 4.7(b) slaganje za  $D_{\text{eff}}$  je samo djelomično. Slaganje teorije i simulacija za izraz

Tablica 4.1: Prikaz svih korištenih izraza za modeliranje  $D_{\text{eff}}$ . U stupcu Reference oznaka E se odnosi na jednadžbe, F na slike i L na literaturu.

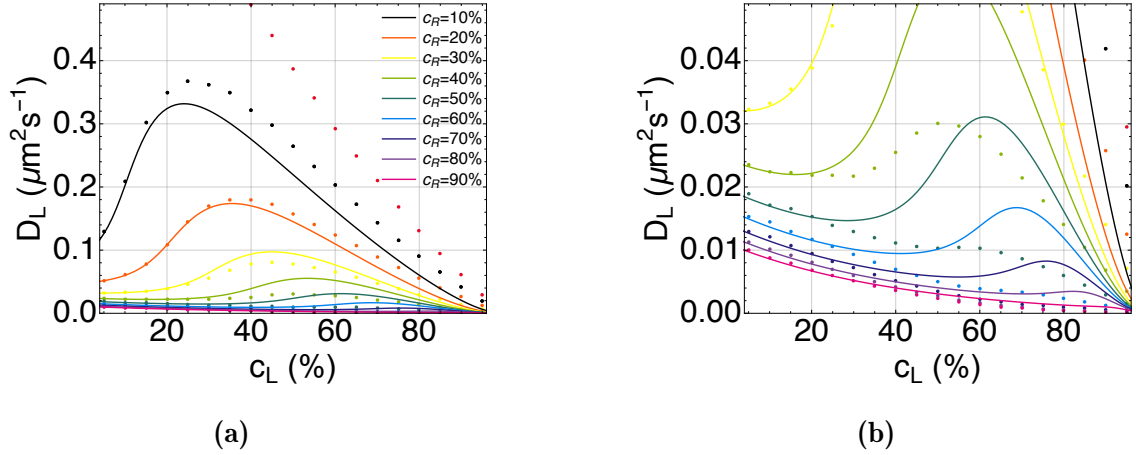
| $D_{\text{eff}}$            | Izraz                                                                                                                                     | Komentar                                                                                       | Reference                                                                    |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1. $D_{\text{eff}}^*$       | $D_{\text{cr}}(c_L) \left(1 - \frac{\langle c_B \rangle}{c_L}\right)$                                                                     | Ne uzima u obzir izmjenu vezanih i nevezanih stanja.                                           | E(2.9),<br>F4.8(a),<br>F4.4(b)                                               |
| 2. $D_{\text{eff}}^{**}$    | $D_{\text{cr}} \left( \frac{c_L - \langle c_B \rangle}{1 - \langle c_B \rangle} \right) \left(1 - \frac{\langle c_B \rangle}{c_L}\right)$ | Korekcija za izuzeti volumen. Loše slaganje sa simulacijama.                                   | E(2.11)                                                                      |
| 3. $D_{\text{eff}}^\dagger$ | $D_{\text{cr}}(c_L) \left(1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}} \langle c_B \rangle}\right)^{-1}$            | Drugačije definiran $k_{\text{off}}$ u master jednadžbi (2.25). Loše slaganje sa simulacijama. | E(2.42)                                                                      |
| 4. $D_{\text{eff}}$         | $D_{\text{cr}}(c_L) \left(1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}} p(c_L)}\right)^{-1}$                         | Najčešće korišten i komentiran izraz. Ne prepoznaje pokretljivost receptora.                   | E(2.19),<br>F??(b)(c),<br>F4.8(b),<br>F4.4(b),<br>F4.3,<br>F2.2(d),<br>L [1] |
| 5. $D'_{\text{eff}}$        | $D_{\text{cr}}(c_L) \left(1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}} p^2(c_L)}\right)^{-1}$                       | Prva korekcija u vremenu $\tau_{\text{on}}$ .                                                  | E(2.22),<br>F4.8(c),<br>F2.2(d)                                              |
| 6. $D''_{\text{eff}}$       | $D_{\text{cr}}(c_L) \left(1 + \frac{P_{\text{on}}(c_R - \langle c_B \rangle)}{P_{\text{off}}(2p^2(c_L) - p^3(c_L))}\right)^{-1}$          | Druga korekcija u vremenu $\tau_{\text{on}}$ , specifičnija za visoko populirane rešetke.      | E(2.23),<br>F4.8(d),<br>F2.2(d)                                              |

(2.19) se detaljno vidi i na slici 4.8(b). Može se primjetiti:

- Slaganje je bolje za male  $c_L \leq 20\%$ , neovisno o iznosu  $c_R$ . To slaganje ide i preko  $c_L = 20\%$  za veće  $c_R$ .
- Za male  $c_R \leq 30\%$  slaganje je relativno dobro za svaki  $c_L$ .
- Za sve  $c_R$  teorijski opis pokazuje postojanje lokalnih maksimuma, što je u slaganju sa simulacijama za  $c_R \leq 50\%$ .

Prema tome možemo razlikovati režim gdje je  $c_L$  vrlo malen i kojeg karakterizira da je većina liganada u vezanom stanju, a preostali ligandi doživljavaju mali efekt gužve. Za taj režim možemo razviti limes izraza (2.19):

$$\lim_{c_L \rightarrow 0} D_{\text{eff}} = \lim_{c_L \rightarrow 0} D_{\text{cr}}(c_L) \left(1 + \frac{P_{\text{on}} c_R - \langle c_B \rangle}{P_{\text{on}} p(c_L)}\right)^{-1} = D_0 \left(1 + \frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}} c_R\right)^{-1}, \quad (4.1)$$



Slika 4.7: Usporedba simulacijskih rezultata i teorijske procjene efektivnih difuzijskih koeficijenata prema izrazu (2.19). Graf (b) je uvećanje grafa (a) po  $y$ -osi, s legendom identičnom grafu (a). Simulacijski rezultati su prikazni točkama, a analitička procjena punim linijama. Crvene točke na grafu (a) i (b) predstavljaju simulaciju slobodne difuzije liganada.

$$\approx D_0 \left( \frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}} c_R \right)^{-1} \quad (4.2)$$

$$D_{\text{cr}}(c_L) \approx D_0 \frac{1 - c_L}{1 + \frac{3}{4}c_L} \approx D_0 (1 - c_L) \left( 1 - \frac{3}{4}c_L \right) \approx D_0 \left( 1 - \frac{7}{4}c_L \right), \quad (4.3)$$

$$D_{\text{eff}}(c_L) \approx D_0 \left[ \left( 1 + \frac{7}{4}c_L \right) \left( 1 + \frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}} c_R + \frac{P_{\text{on}}}{P_{\text{off}}} \left( \frac{7}{4}c_R - 1 \right) c_L \right) \right]^{-1}, \quad (4.4)$$

gdje aproksimacija (4.2) vrijedi za  $P_{\text{on}}/P_{\text{off}} \gg 1$ , a aproksimacije (4.3) i (4.4) za  $c_L \ll 1$ . Aproksimacije se izvrsno slažu sa simulacijama pa možemo zaključiti da model dobro objašnjava difuziju u tome režimu.

Ako usporedimo limes efektivnog difuzijskog koeficijenta kada  $c_L \rightarrow 0$  (4.1) sa standardnom definicijom efektivnog difuzijskog koeficijenta:  $\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle = 4D_{\text{eff}}\tau = 4D_{\text{eff}}(\tau_{\text{on}} + \tau_{\text{off}})$  dobivamo:

$$\frac{\tau_{\text{on}}}{\tau_{\text{off}}} = \frac{P_{\text{on}}c_R}{P_{\text{off}}} \quad (4.5)$$

odakle možemo zaključiti da je prema modelu (a i simulacijama) prosječno efektivno trajanje boravka liganada na receptoru proporcionalno vjerojatnosti vezivanja i broju veznih mjesta, tj. koncentraciji receptora, koji su svi slobodni u ovome režimu. S druge strane, prosječno trajanje slobodne difuzije proporcionalno je vjerojatnosti odvezivanja: što je veća vjerojatnost da se ligand odveže to će više vremena provesti u slobodnoj difuziji po membrani. U spomenutom režimu, susret sa svakim receptorom je potencijalno mjesto vezivanja, a svako odvezivanje je ravnopravno što znači da ne trebamo uvoditi korektivne faktore poput  $p(c_L)$  zbog efekta gužve.

Spomenut je još jedan režim u kojem dolazi do slaganja simulacija i teorijskog modela: režim kada  $c_R \approx 0$ . U tome režimu receptora ima u svakom slučaju malo i većina je vezana za ligande. Ligandi su većinom slobodni i dostupna im je cijela rešetka za difuziju. Model u tome režimu daje  $D_{\text{eff}} \rightarrow D_{\text{cr}}$  tako da dobro slaganje simulacija i modela u ovome režimu je do male greške modela za  $D_{\text{cr}}$  (2.7).

Radi lakšeg proučavanja režima u kojemu izraz (2.19) ne daje slaganje sa simulacijama i testiranja nekih drugih izraza za efektivni difuzijski koeficijent navedenih u tablici 4.1, na slici 4.8 su prikazane relativne greške različitih teorija u odnosu na simulacije, definirane kao

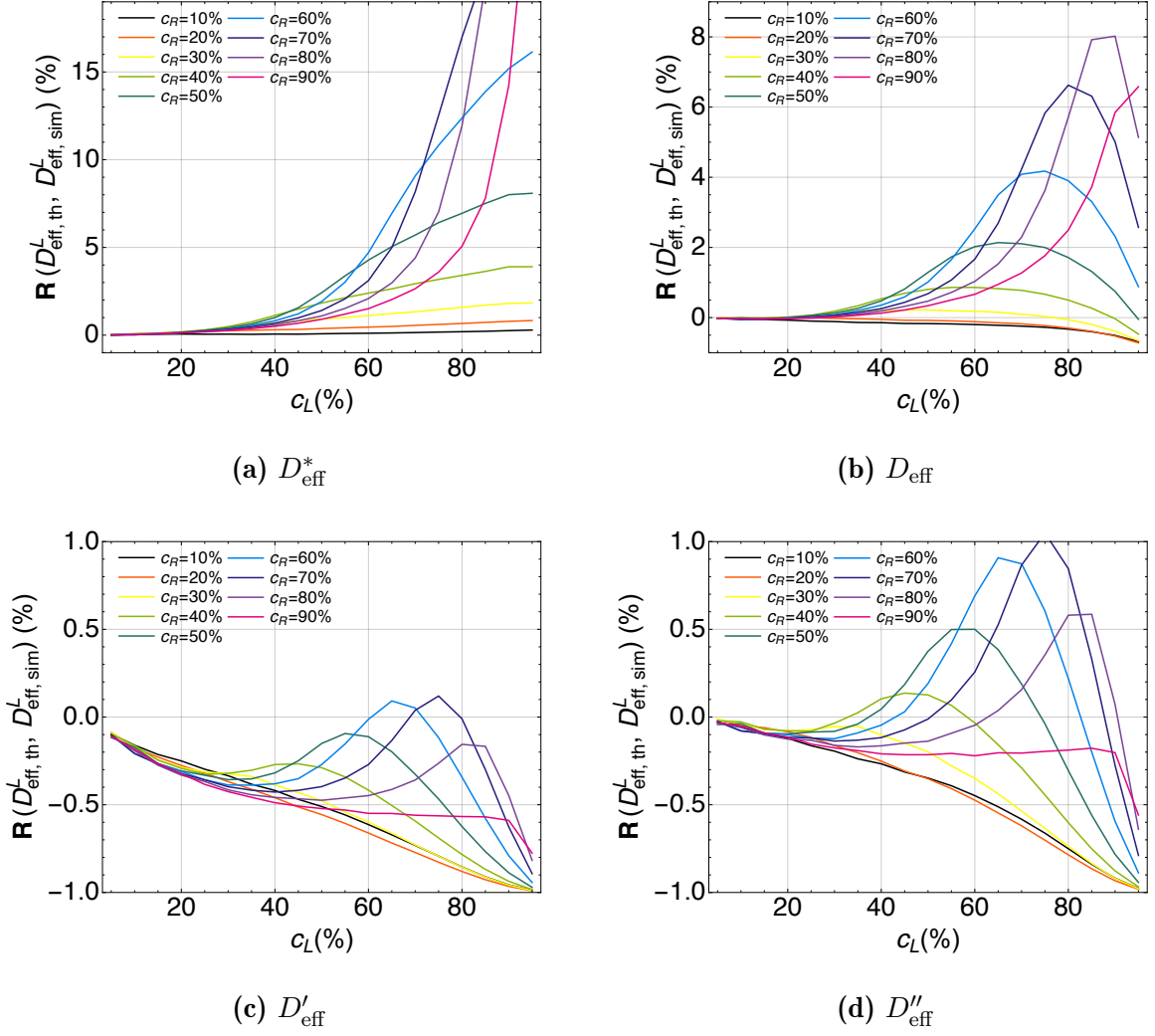
$$\mathbf{R}(D_{\text{eff,th}}, D_{\text{eff,sim}}) = \frac{D_{\text{eff,th}} - D_{\text{eff,sim}}}{D_{\text{eff,sim}}}. \quad (4.6)$$

Na slikama 4.8(a) i 4.8(b) vidi se da se simulacije dobro slažu s teorijom u opisana dva režima: za male  $c_L$  i za male  $c_R$ . Neslaganje počinje u režimu velikih  $c_L \gtrsim c_R$ , za velike koncentracije  $c_R$  i pokazuje precjenjenje efektivnog difuzijskog koeficijenta. U tome režimu imamo visoke koncentracije receptora i liganada i naglašene efekte gužve.

U model opisan izrazom  $D_{\text{eff}}^*$  (2.9) nije uključen efekt izmjene populacija vezanih i nevezanih liganada, tj. receptora. Prema tome ne čudi opaženo neslaganje i precjenjenje simulacija teorijom. Taj model ne uključuje nijedne događaje koji dodatno opterećuju difuzijski sustav.

Što se tiče modela vezanog za izraz  $D_{\text{eff}}$  (2.19), visoke koncentracije  $c_R$  i  $c_L$  osiguravaju dugačke, modelom definirane,  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$  (2.13) i dugačka modelom definirana efektivna vremena slobodne difuzije  $\tau_{\text{off}}$  (2.14). Neslaganje teorije i simulacija vjerojatno dolazi od toga što se ligandi u sustvu ne ponašaju tako nego se tijekom slobodne difuzije po membrani često vežu na neki modelom nepredviđeni receptor koji u trenutku procjene nije bio slobodan. Time je broj stacionarnih boravaka povećan, vrijeme slobodne difuzije skraćeno i efektivni difuzijski koeficijent dodatno reduciran. Ti dodatni efekti nisu uključeni u model opisan izrazom  $D_{\text{eff}}$  (2.19).

Pokušali smo popraviti izraz (2.19) u komentiranom režimu koncentracija  $c_L$  i  $c_R$  uvodeći popravak koji produžuje vrijeme boravka liganda na receptoru  $\tau_{\text{on}}$  (2.18). Predložili smo izraze  $\tau'_{\text{on}}$  (2.20) i  $\tau''_{\text{on}}$  (2.21). Na taj način izbacujemo one putanje koje se neće ostvariti onako kako smo mi predvidjeli. Njihovo slaganje sa simulacijama je prikazano na slikama 4.8(c) i 4.8(d). Slaganje je poboljšano u odnosu na izraz (2.19)



Slika 4.8: Usporedba simulacijskih rezultata i različitih analitičkih procjena za efektivni difuzijski koeficijent, kako su definirani u tablici 4.1. Na ordinati se nalazi relativna greška teorije u odnosu na simulacije  $\mathbf{R}$ , definirana sa (4.6). U tekstu se uglavnom koristi izraz za  $D_{\text{eff}}$  korišten na grafu (b), preuzet iz [1].

i pokazuje podcjenjenje efektivnog difuzijskog koeficijenta, ali i dalje imamo isti oblik krivulje za relativnu grešku. To ukazuje da jednostavnim manipulacijama ne možemo kvalitativno poboljšati slaganje postojeće teorije sa simulacijama.

## 5 Zaključak

Proučili smo difuziju čestica u membrani u posebnom postavu prikazanom na slici 1.2. Razlikovali smo dvije podvrste čestica, ligande i receptore, smještene na odvojenim membranama koje pod određenim uvjetima međudjeluju i stvaraju nepomične komplekse.

U poglavlju 2 smo primjetili da pri razmatranju efektivnih difuzijskih koeficijenata moramo imati na umu činjenicu da postoji stacionarna i mobilna populacija liganada tj. receptora, da su one u stalnoj izmjeni (eng. *overturn*) i da postoji fluktuacija  $c_B$  oko prosječne vrijednosti koncentracije veza  $\langle c_B \rangle$  (2.61). Difuziju možemo konceptijski odvojiti na periode slobodne difuzije po membrani i periode boravka na receptorima. Uveli smo veličinu  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$  (2.13) koja nam zajedno s  $D_{\text{cr}}$  (2.7) daje predviđanje tog efektivnog perioda slobodne difuzije  $\tau_{\text{off}}$  (2.14) i oznaku  $\tau_{\text{on}}$  za trajanje perioda efektivnog boravka liganada na receptorima. Za efektivno vrijeme boravka liganada na receptorima smo uveli nekoliko predviđanja, (2.18), (2.20) i (2.21). Prema tome, izvedeno je nekoliko izraza za efektivni difuzijski koeficijent pregledno prikazanih u tablici 4.1.

Gibanje čestica smo simulirali računalom i odatle izračunavali koncentraciju vezanih stanja i efektivni difuzijski koeficijent čestica. Mjenjali smo različite parametre simulacije: intrinzičnu pokretljivost čestica (potpoglavljje 4.2), energiju vezanja čestica (potpoglavljje 4.3), ukupne koncentracije čestica na rešetkama (potpoglavljje 4.4). Izveden izraz za prosječni broj vezanih čestica (2.61) se izvrsno slaže sa svim rezultatima simulacija.

Efektivni difuzijski koeficijent liganada raste s porastom intrinzične pokretljivosti receptora na susjednoj membrani. Naša je pretpostavka da razlog tome leži u činjenici da intrinzična pokretljivost receptora smanjuje efektivno prosječno vrijeme boravka čestica liganada na receptorima i povećava efektivno vrijeme boravka čestice liganda u slobodnoj difuziji. Detaljni izraz koji bi opisivao tu pojavu nismo tražili. Efektivni difuzijski koeficijent pada s porastom energije vezanja. Za simulirane režime, model opisan izrazom (2.19) daje dobro slaganje s simulacijama.

Efektivni difuzijski koeficijent pokazuje složeno ponašanje u ovisnosti o koncentracijama čestica liganada i receptora. Efektivni difuzijski koeficijent liganada se smanjuje porastom koncentracija receptora. Porast koncentracije liganada dovodi do blagog po-

rasta efektivnog difuzijskog koeficijenta liganada i kasnije pada, što predstavlja lokalni maksimum efektivnog difuzijskog koeficijenta. Mnogi modeli uspješno reproduciraju trend ((2.19), (2.9), (2.22), (2.23)), ali dobro kvantitativno slaganje pokazuju samo za manje koncentracije liganada ili receptora. Lokalni maksimum se nalazi u području dobrog slaganja simulacija s modelima, prvenstveno s modelom danim izrazom (2.19). Prema tome taj model uspješno objašnjava pojavu lokalnog maksimuma: vezivanjem određenog broja liganada za receptore efektivni broj receptora slobodnih za vezanje se smanjuje, što za preostale ligande olakšava difuziju i povećava difuzijski koeficijent.

Korisno je u razmatranju efektivne difuzije u ovisnosti o koncentracijama liganada i receptora promotriti različite režime u kojima različiti fenomeni doprinose vrijednosti efektivnog difuzijskog koeficijenta tako što mijenjaju trajanje efektivnih vremena:  $\langle \tau_{\text{on}} \rangle$  i  $\langle \tau_{\text{off}} \rangle$ . Na niskim koncentracijama liganada prihvatljiva je slika gdje ligand slobodno difundira između dva receptora na udaljenosti  $\sqrt{\langle l_{\text{eff}}^2 \rangle}$  danom izrazom (2.13). Na visokim koncentracijama liganada efekt gužve jako otežava realizaciju relativno (i prostorno i vremenski) dugačkih putanja predviđenih izrazom (2.13), tako da događaji inače male vjerojatnosti imaju velik utjecaj na transport, tj. efektivni difuzijski koeficijent. Ti događaji navedeni su u točkama na stranici 19. Npr. dok se ligand giba moguće je da dođe do trenutnog odvezivanja nekog usputnog receptora koji posluži za novo nepredviđeno pristanište ligandu. Time se skraćuje  $\tau_{\text{off}}$  i boravci postaju učestaliji — posljedično difuzijski koeficijent je dodatno smanjen.

U konačnici, detaljno proučavanje difuzije u biološkim membranama u ovisnosti o različitim parametrima je od velikog istraživačkog interesa zato jer se komunikacija stanice i okoliša zbiva preko membrane u procesima koji uvijek uključuju lateralnu difuziju različitih čestica po membrani. Poznavanje detaljne fizike i kemije stanične difuzije omogućuje bolje razumijevanje biološke svrhe i dosega svih procesa koji se oslanjaju na takav transport.



## Literatura

- [1] M. Cvitković, “Diffusive processes in two-dimensional environments of membranes.” Doktorska dizertacija je u pripremi na sveučilištu Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg.
- [2] R. Brown, “A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies,” *Phil. Mag.*, vol. 4, no. 21, pp. 161–173, 1828.
- [3] A. Fick, “On liquid diffusion,” *Journal of Membrane Science*, vol. 100, no. 1, pp. 33 – 38, 1995. The early history of membrane science selected papers celebrating vol. 100.
- [4] A. Einstein, *Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen: Inaugural-Dissertation zur Erlangung der philosophischen Doctorwürde der hohen Philosophischen Fakultät (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion) der Universität Zürich*. Zürich: Universität Zürich, 1905.
- [5] W. Sutherland, “Dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin,” *Phil. Mag.*, vol. 9, no. 54, pp. 981–785, 1905.
- [6] M. v. Smoluchowski, “Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen,” *Ann. Phys.*, vol. 326, no. 14, pp. 756–780, 1906.
- [7] M. J. Perrin, “La loi de Stokes et le mouvement brownien,” *Cr. Hebd. Acad. Sci.*, vol. 147, pp. 475–476, 1908.
- [8] M. J. Perrin, “L’origine du mouvement brownien,” *Cr. Hebd. Acad. Sci.*, vol. 147, pp. 530–532, 1908.
- [9] M. P. Langevin, “Sur la théorie du mouvement brownien,” *Cr. Hebd. Acad. Sci.*, vol. 146, pp. 530–533, 1908.
- [10] A. D. Fokker, “Die mittlere Energie rotierender elektrischer Dipole im Strahlungsfeld,” *Ann. Phys.*, vol. 348, no. 5, pp. 810–820, 1914.

- [11] M. Planck, “Über einen Satz der statistischen Dynamik und seine Erweiterung in der Quantentheorie,” *Sitzungsberichte der Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*, pp. 324–341, 1917.
- [12] A. N. Kolmogorov, “Über die analytischen Methoden in der Wahrscheinlichkeitsrechnung,” *Mathematische Annalen*, vol. 104, no. 1, pp. 415–458, 1931.
- [13] R. Metzler and J. Klafter, “The random walk’s guide to anomalous diffusion: a fractional dynamics approach,” *Phys. R.*, vol. 339, no. 1, pp. 1 – 77, 2000.
- [14] J.-P. Bouchaud and A. Georges, “Anomalous diffusion in disordered media: Statistical mechanisms, models and physical applications,” *Phys. Rep.*, vol. 195, no. 4–5, pp. 127 – 293, 1990.
- [15] R. Fürth, “Die Brownsche Bewegung bei Berücksichtigung einer Persistenz der Bewegungsrichtung. Mit Anwendungen auf die Bewegung lebender Infusorien,” *Z. Phys.*, vol. 2, no. 3, pp. 244–256, 1920.
- [16] B. M. Regner, D. Vučinić, C. Domnisoru, T. M. Bartol, M. W. Hetzer, D. M. Tartakovsky, and T. J. Sejnowski, “Anomalous diffusion of single particles in cytoplasm,” *Biophysical Journal*, vol. 104, no. 8, pp. 1652 – 1660, 2013.
- [17] J. Ferreira, G. Pena, and G. Romanazzi, “Anomalous diffusion in porous media,” *Applied Mathematical Modelling*, vol. 40, no. 3, pp. 1850 – 1862, 2016.
- [18] J. W. Haus and K. W. Kehr, “Diffusion in regular and disordered lattices,” *Phys. Rep.*, vol. 150, no. 5-6, pp. 263 – 406, 1987.
- [19] L. van Hove, “Correlations in space and time and born approximation scattering in systems of interacting particles,” *Phys. Rev.*, vol. 95, no. 1, pp. 249–262, 1954.
- [20] F. Höfling and T. Franosch, “Anomalous transport in the crowded world of biological cells,” *Rep. Prog. Phys.*, vol. 76, no. 4, p. 046602, 2013.
- [21] J.-P. Hansen and I. McDonald, *Theory of Simple Liquids. With Applications to Soft Matter*. Amsterdam: Academic Press, 4 ed., 2013.
- [22] R. Metzler, J.-H. Jeon, A. G. Cherstvy, and E. Barkai, “Anomalous diffusion models and their properties: non-stationarity, non-ergodicity, and ageing at the cen-

- tenary of single particle tracking,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, pp. 24128–24164, 2014.
- [23] B. B. Mandelbrot and J. W. van Ness, “Fractional brownian motions, fractional noises and applications,” *SIAM Review*, vol. 10, no. 4, pp. 422–437, 1968.
  - [24] E. W. Montroll and G. H. Weiss, “Random walks on lattices. ii,” *J. Math. Phys.*, vol. 6, no. 2, pp. 167–181, 1965.
  - [25] E. W. Montroll, “Random walks on lattices. III. calculation of first-passage times with application to exciton trapping on photosynthetic units,” *J. Math. Phys.*, vol. 10, no. 4, pp. 753–765, 1969.
  - [26] H. Scher and E. W. Montroll, “Anomalous transit-time dispersion in amorphous solids,” *Phys. Rev. B*, vol. 12, no. 6, pp. 2455–2477, 1975.
  - [27] E. W. Montroll and B. J. West, “On an enriched collection of stochastic processes,” in *Fluctuation Phenomena* (E. W. Montroll and J. L. Lebowitz, eds.), pp. 61–175, Amsterdam: Elsevier North Holland, 1979.
  - [28] R. J. Ellis and A. P. Minton, “Join the crowd,” *Nature*, vol. 425, pp. 27–28, 2003.
  - [29] H. Shen, L. J. Tauzin, R. Baiyasi, W. Wang, N. Moringo, B. Shuang, and C. F. Landes, “Single particle tracking: From theory to biophysical applications,” *Chemical Reviews*, vol. 117, no. 11, pp. 7331–7376, 2017. PMID: 28520419.
  - [30] C. E. Rowland, J. B. Delehanty, C. L. Dwyer, and I. L. Medintz, “Growing applications for bioassembled förster resonance energy transfer cascades,” *Materials Today*, vol. 20, no. 3, pp. 131 – 141, 2017.
  - [31] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, and G. P. C. Drummen, “Advanced fluorescence microscopy techniques—frap, flip, flap, fret and flim,” *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 4047–4132, 2012.
  - [32] D. Magde, E. Elson, and W. W. Webb, “Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 29, pp. 705–708, 1972.
  - [33] E. L. Elson, “Fluorescence correlation spectroscopy: Past, present, future,” *Biophysical Journal*, vol. 101, no. 12, pp. 2855 – 2870, 2011.

- [34] V. M. Sukhorukov, D. Dikov, K. Busch, V. Strecker, I. Wittig, and J. Bereiter-Hahn, “Determination of protein mobility in mitochondrial membranes of living cells,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1798, no. 11, pp. 2022–2032, 2010.
- [35] A. Baker, A. Saulière, F. Dumas, C. Millot, S. Mazères, A. Lopez, and L. Salomé, “Functional membrane division of g-protein coupled receptors,” *European Biophysical Journal*, vol. 36, p. 849–860, 2007.
- [36] G. J. Digby, R. M. Lober, P. R. Sethi, and N. A. Lambert, “Some G-protein heterotrimers physically dissociate in living cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 47, pp. 17789–17794, 2006.
- [37] K. Nakazato and K. Kitahara, “Site blocking effect in tracer diffusion on a lattice,” *Prog. Theor. Phys.*, vol. 64, no. 6, pp. 2261–2264, 1980.
- [38] R. A. Tahir-Kheli, “Correlation factors for atomic diffusion in nondilute multi-component alloys with arbitrary vacancy concentration,” *Phys. Rev. B*, vol. 28, no. 6, pp. 3049–3056, 1983.
- [39] H. van Beijeren and R. Kutner, “Mean square displacement of a tracer particle in a hard-core lattice gas,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 55, pp. 238–241, 1985.
- [40] W. A. Muller, “Getting leukocytes to the site of inflammation,” *Veterinary Pathology*, vol. 50, p. 7–22, 2013.
- [41] C. J. Penington, B. D. Hughes, and K. A. Landman, “Building macroscale models from microscale probabilistic models: A general probabilistic approach for nonlinear diffusion and multispecies phenomena,” *Phys. Rev. E*, vol. 84, p. 041120, 2011.
- [42] M. Abramowitz, *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables*. Dover Publications, INC., 9th ed., 1972.
- [43] G. Orädd and G. Lindblom, “Nmr studies of lipid lateral diffusion in the dmpe/gramicidin d/water system: Peptide aggregation and obstruction effects,” *Biophysical Journal*, vol. 87, no. 2, pp. 980 – 987, 2004.
- [44] W. R. Inc., “Mathematica, Version 11.2.” Champaign, IL, 2017.