

Samostalni seminar iz istraživačke fizike

Modeliranje intermikrotubularne dinamike računalnim stokastičkim metodama

Bruno Buljan, F-4112
mentor: prof. Matko Glunčić, dr. sc.

Fizički odsjek, PMF, Bijenička 32, 10 000 Zagreb
28. siječnja 2017.

Sažetak

U seminaru se iznose osnove biokemije citoskeleta i mikrotubula, te načini na koje se pristupa matematičkom i računalnom modeliranju raznih procesa koji tiču citoskeleta i sastavnih djelova. Koristeći se metodom fiksnog vremenskog koraka, modelira se dinamika para antiparalelno postavljenih mikrotubula u citoplazmi ispunjenoj aktivnim (motornim) i pasivnim *linker* proteinima. Rezultati modeliranja su prikazani na nizu uzastopnih kimograma za par određenih vrijednosti slobodnih parametara modela. Raspravljen je način na koji formirani model daje te rezultate i kako to doprinosi ostvarivanju strukturno bitne parcijalne interdigitacije mikrotubula. Nadalje, diskutiraju se metode predočavanja podataka, variranja koda i proširenja modela u svrhu ostvarivanja konstruktivnog ciklusa izmjene eksperimenta *in vivo/vitro* i računalne simulacije *in silico* koji je bitan na području znanstvenog (računalnog) modeliranja.

Ključne riječi

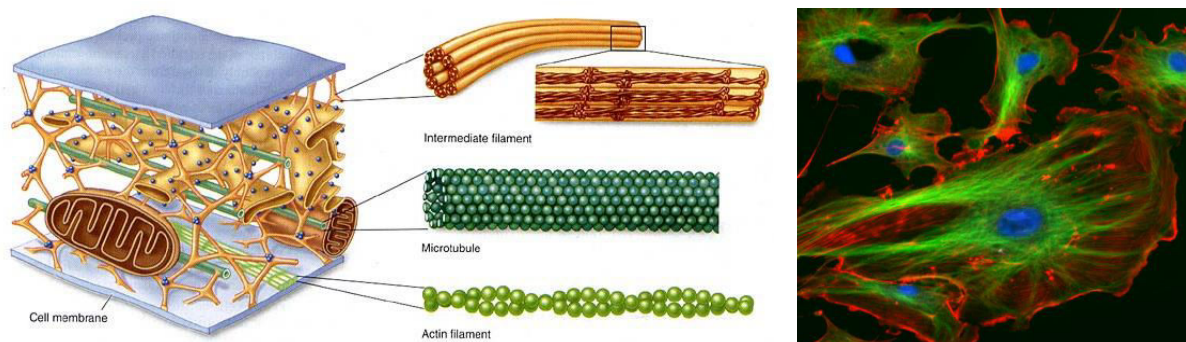
stanica, citoskelet, mikrotubuli, mitoz, centrosom, centriol; stokastičke metode, simulacija na razini molekule/događaja, Gillespiejev algoritam (SSA), algoritam fiksnog vremenskog koraka; kimografa reprezentacija događanja, testiranje; C, Python, Sagemath.

Uvod

Stanica je temeljna organizacijska jedinica svakog organizma sa svojom poznatom podstrukturom: jezgrom okruženom citoplazmom i staničnom membranom. U citoplazmi djelomice plivaju, a djelomice su usidrene raznorodne organele. Sve te strukture povezuju i učvršćuju filamentozni proteini koji se zajedničkim imenom nazivaju stanični citoskelet. Na taj način citoskelet osigurava mehaničku potporu i igra strukturnu ulogu u stanici: daje stabilan oblik npr. eritrocitima, neuronima, a po njegovim filamentima mogu se transportirati stanični produkti (npr. neuropeptidi uzduž mikrotubula aksona). Osim statičke uloge, citoskelet se može brzo transformirati ponajprije procesima fosforilacije i defosforilacije (npr. u procesima jezgrene membranolize u mitoz, migracije leukocita kroz endotel krvnih kapilara ili mišićne kontrakcije) pa na taj način zauzima i dinamičke uloge. Možda najbitnija dinamička uloga citoskeletne strukture je u procesu mitoze kad je potrebno organizirano polarizirati sav stanični sadržaj u dvije približno identične nakupine.

Citoskelet se sastoji od od aktinskih, intermedijarnih i mikrotubularnih vlakana, gdje svaki tip ima svoje posebne uloge i shodno tome pridružene proteine. Nas prvenstveno zanimaju mikrotubuli, dugačke cilindrične proteinske strukture izgrađene polimerizacijom globularnih tubulinskih dimera. Mikrotubuli su konstantno u procesu polimerizacije ili depolimerizacije na svojiim krajevima, što odgovara nasumičnoj izmjeni faza produljivanja i skraćivanja mikrotubula. Također, mikrotubuli na svoja dva kraja nemaju identična kemijska svojstva, pa razlikujemo (-) i (+) kraj mikrotubula. (+) kraj mikrotubula je kemijski aktivnije mjesto gdje je brzina pregradnje veća.

Uz mikrotubule su povezane skupine proteina MAP (eng. microtubule associated proteins) i MAP-



Slika 1 Prikaz staničnog citoskeleta u shemi i pomoću konfokalnog fluorescentnog mikroskopa. Izvor : Wikipedija

kinaze od kojih su najbitniji aktivni (motorni) i pasivni *linker* proteini.

I jedni i drugi *linker* proteini imaju vezivna mjesta na tubulinskim dimerima mikrotubula te kako su izduženi, mogu se vezivati na oba svoja kraja i tako premošćavati udaljenost između dva susjedna mikrotubula. Kako je mikrotubul polimer, vezivna mjesta za te proteine na mikrotubulima se ponavljaju i proteini se mogu odvezivati sa jednog mjesta i vezivati na slijedeće. Takvo ponašanje se naziva skakanjem (eng. hopping). Razlika između aktivnih i pasivnih linker proteina je u tome što aktivni proteini pokazuju hopping samo u jednom smjeru mikrotubula (npr (+) smjeru), što je potaknuto hidrolizom energetske molekule ATP-a, a pasivni proteini sudjeluju u hopping procesima nasumičnog smjera, čemu ponajprije doprinosi difuzivno gibanje vezivnog kraja odvezanog proteina. Svežnjevi mikrotubula izgrađuju, među ostalom, i centriole centrosoma, koji je dio citoskeleta zadužen za mitozu. Ključna strukturna komponenta centriola su parcijalne antiparalelne interdigiracije mikrotubula što omogućava rast mikrotubula iz centriola da bi se u konačnici prihvatili za kinetohoru kromosoma i omogućili razdvajanje genetskog materijala.

Istraživanje mikrotubula i njihove dinamike ima prvenstveno fundamentalnu ulogu u shvaćanju načina na koji funkcionira stanica, a istražuju se metodama eksperimantalne biologije (npr. konfokalna fluorescentna mikroskopija) i računalne biologije. Računalnoj biologiji je u interesu napraviti matematički model nekog procesa te ga pokušati opisati kontinuiranim distribucijama preko diferencijalnih jednadžbi ili računalno simulirati stokastičnim metodama.

Postoji povratna sprega između računalnog i eksperimentalnog dijela istraživanja gdje se model konstantno mijenja kako bi se prilagodio podatcima dobivenim opažanjem.

Metodologija

Dva su pristupa koja se najčešće koriste u računalnoj simulaciji određenog modela su algoritam fiksnog vremenskog koraka i Gillespijev algoritam.

Algoritam fiksnog vremenskog koraka je algoritam u kojem se simuliraju događaji nad određenim strukturama unutar malenog fiksnog vremenskog intervala. Vjerojatnost svakog događanja se prikazuje frekvencijom događanja toga događaja u slobodnim uvjetima (definicija slobodnih uvijeta ovisi o vrsti procesa koji se razmatra). Za svaki vremenski interval prolazi se kroz niz mogućih događaja i za svaki se individualno odlučuje da li će se dogoditi ili ne na temelju usporedbe slučajnog odabira broja r između 0 i 1 i njegove vjerojatnosti izražene kao ωdt , gdje je ω spomenuta frekvencija. Ukoliko je $r < \omega dt$ unosi se odgovarajuća promjena u strukturu koju opisuje model.

U ovome pristupu mora vrijediti nejednakost $\omega dt < 1$, i ωdt biti dovoljno malen da od niza događaja uvijek bude izabran samo jedan događaj, što se postiže izabiranjem jako malenog intervala dt . Na taj način u velikom broju iteracija se ne događa ništa i računalo mora proći kroz mnoge iteracije da bi se uhvatila vremenska evolucija modela. Istovremeno, što je manji dt , to je izvršavanje programa dulje,

pa se prilikom odabira parametara za simulaciju pokušava naći što optimalniji set koji bi što točnije omogućio implementaciju modela i što kraće vrijeme izvršavanja simulacije.

Gillespiejev algoritam je drugačiji od prethodnog pristupa u tome što se slučajnim odabirom odabire i trenutak slijedećeg događaja i koji će to događaj biti. Na taj način Gillespiejev algoritam zaobilazi prethodno komentirane probleme algoritma fiksnog vremenskog koraka. Jedini problem koji se može pojavljivati kod implementacije Gillespiejeva algoritma je što u nekim slučajevima zahtijeva veliku memoriju kako bi se pohranili svi mogući događaji nad nekom strukturom i problematičan je u slučaju kada izbor mogućih događaja ovisi o trenutnom stanju modelirane strukture.

Ulazni parametri Gillespiejeva algoritma su frekvencije izvršavanja događaja : $\{\omega_1, \dots, \omega_N\}$. Pretpostavimo li da od trenutka $t = 0$ do $t = \tau$, nema događanja i da se događaj j dogodi tek u trenutku τ , vjerojatnost takvog scenarija je :

$$P = P(\text{nije se dogodio niti jedan događaj}) * P(\text{dogodio se događaj } j \text{ u } dt \text{ trenu kad } t = \tau)$$

Što se može dalje rastaviti na :

$$P = P(\text{nije se dogodio niti jedan događaj}) * \omega_j dt$$

Ako podjelimo interval τ na niz malih $d\tau$ možemo pisati:

$$P(\tau, j) = \lim_{M \rightarrow \infty} \left(1 - \frac{\sum \omega_j \tau}{M}\right)^M (\omega_j dt) = \exp\left(-\sum \omega_i \tau\right) \omega_j dt \quad (*)$$

Stoga se Gillespiejev algoritam svodi na određivanje dva slučajna broja r_1 i r_2 u intervalu $[0,1 >$. Prvi slučajni broj generira vrijeme τ , pomoću formule:

$$\tau = \frac{1}{\sum \omega_j} \ln \frac{1}{r_1}$$

Drugi slučajni broj određuje koji će se događaj dogoditi. Skaliramo li r_2 na $(\sum_j \omega_j)r_2$ i ustalimo konstantni poredak događaja j , izabran će biti onaj događaj j za kojeg vrijedi:

$$\sum_{i=1}^{j-1} \omega_i \leq \left(\sum_j \omega_j\right) r_2 < \sum_{i=1}^j \omega_i$$

Lako se može pokazati zašto vrijedi formula (*). Pretpostavimo da postoji proces koji daje slučajno vremena τ sukladno zadanoj raspodjeli. Odaberemo li dva proizvoljna vremena i izračunamo li kolika je vjerojatnost , tj. broj slučajeva da se unutar ta dva vremena ne dogodi događaj (a dogodi na kraju tih trenutaka) dobivamo:

$$W(t_1, t_2) = \int_{t_1}^{t_2} \exp(-t \sum \omega_j) dt = -\frac{1}{\sum \omega_j} [\exp(-t_2 \sum \omega_j) - \exp(-t_1 \sum \omega_j)]$$

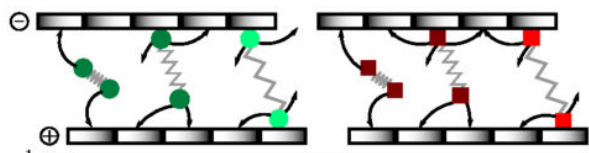
$$W(t_1, t_2) = -\frac{1}{\sum \omega_j} (P(t_2) - P(t_1))$$

Odatle možemo zaključiti da je vjerojatnost, tj. broj događaja uniformno distribuiran duž kodomene P funkcije, pa stoga odabir proizvoljnog broja (vrlo uskog intervala) unutar te kodomene ($[0,1 >$) odgovara odabiru $PDF(\tau)$, a τ se lako dobije invertiranjem te funkcije. Činjenica da se odabire slučajan

broj unutar $[0, 1>$ domene, može se shvatiti kao prethodno spomenuti proces dobrog odabiranja vremena, samo unatrske. Da je funkcija P drugačija, ova se procedura ne bi mogla upotrebljavati.

Za simulaciju modela intermikrotubularne dinamike odabran je algoritam fiksnog vremenskog koraka, ponajprije zato jer je njegova implementacija bila jednostavnija. Također, Gillespiejev algoritam zahtjeva veću radnu memoriju u slučaju ovog modela ako se razmotre svi događaji j koji bi se trebali uzimati u obzir i kako se ovisno o trenutnom stanju mikrotubula svaki put dobiva novi niz događaja.

Model, implementacija modela i vizualizacija podataka



Slika 2 Prikaz modela sa dozvoljenim procesima. Zeleni kružići su aktivni linkeri, a crveni kvadratići pasivni.

U radu je ramotren slučaj dva antiparalelno postavljena mikrotubula u citoplazmi. Svaki mikrotubul je modeliran kao niz $N = 20$ tubulinskih dimera. Svaki tubulinski dimer ima 1 vezivno mjesto za 1 aktivni ili 1 pasivni protein. Proteini bilo pasivni ili aktivni mogu se vezati iz citoplazme na tubulinski dimer (eng. *occupation*), odvezati sa jednim krajem sa tubulinskog dimera

(eng. *deattachment*), bilo da su bili vezani na oba svoja kraja ili samo na jedan kraj, povezati se sa drugim vezivnim mjestom na

drugom mikrotubulu (eng. *crosslinking*) ili skakati (eng. *hopping*) po mikrotubulu unaprijed ili unazad (pasivni *linker* proteini), bilo da su vezani na oba kraja (eng. *doublebinded*) ili na jedan kraj (eng. *singlebinded*). Skakanje je dozvoljeno samo ako slijedeće mjesto na mikrotubulu je prazno i ako je na mikrotubulu. Skakanje sa mikrotubula u citoplazmu je zabranjeno. Kao što je komentirano ranije skakati mogu i aktivni i pasivni mikrotubuli. Detalji svih takvih događaja i mjere njihove vjerojatnosti su dane u Tablici 1.

Tabela 1 Prikaz mogućih događaja i njihova parametrizacija. (ap - active linker protein, pp - passive linker protein, sb -single binded, db - double binded)

dogadjaj	frekvencija događnja	komentar
<i>occupation</i>		
- ap	ω_o^a	
- pp	ω_o^p	
<i>deattachment</i>		
- sb, ap	ω_d^a	k_a i k_p su Hookeove konstante za aktivne i pasivne proteine. ξ je elongacija linkera. f_a i f_p su karakteristične veličine za silu.
- sb, pp	ω_d^p	
- db, ap	$\omega_d^a \exp(k_a \xi / f_a)$	
- db, pp	$\omega_d^p \exp(k_p \xi / f_p)$	
<i>crosslinking</i>		
- ap	$\frac{\omega_c^a}{\sqrt{2\sigma^2\pi}} \exp\left(-\frac{\xi^2}{2\sigma^2}\right)$	σ je karakteristična vrijednost rasapa pozicije vezujućeg kraja u odnosu na vezni kraj linkera.
- pp	$\frac{\omega_c^p}{\sqrt{2\sigma^2\pi}} \exp\left(-\frac{\xi^2}{2\sigma^2}\right)$	
<i>hopping</i>		
- sb, ap	γ	\pm označava dvije vrijednosti frekventnosti događanja ovisno o tome da li pasivni linker događajem smanjuje ili povećava napetost proteina. Favorizirana je relaksacija.
- sb, pp	D	
- db, ap	$\gamma \exp(k_a \xi / f_a)$	
- db, pp	$D \exp(\pm k_p \xi / f_p)$	

Proteini koji se vezuju na oba mikrotubula mogu se modelirati kao opruge i ovisno o njihovoj elongaciji proizvoditi silu na mikrotubule. Mikrotubuli na silu odgovaraju svojim gibanjem, u ovom slučaju smicanjem, brzinom koja je proporcionalna sili i dobiva se iz $\sum F = \mu v$, gdje μ predstavlja koeficijent trenja mikrotubula sa citoplazmom. Mikrotubuli se uslijed toga pomaknu za $dx = v dt$, što dovodi do promjene različitih elongacija i nove dinamičke situacije.

Svi gore spomenuti

Tabela 2 Prikaz numeričkih vrijednosti parametara korišten u simulaciji

ω_o^a	0.316 Hz	k_a^*	0.11 pN/nm	μ	0.1 pNs/nm
ω_o^p	0.0004 Hz	k_p^*	0.11 pN/nm	γdt	0.001
ω_d^a	1.56 Hz	f_a^*	9 pN	$N_{veznih\ mjesta}$	20
ω_d^p	0.0017 Hz	f_p^*	9 pN	$N_{iteracija}$	300 000
γ	12 Hz	σ	8 nm		
D	12 Hz	l	8 nm		

parametri i njihove u najvećem broju slučajeva eksperimentalno dobivene vrijednosti su prikazane u Tablici 2. Dio tih parametara je slobodan i podložan staničnoj kontroli. Tu se prvenstveno misli na ω_o^a i ω_o^p , koji korespondiraju najviše količini slobodnih proteina u citoplazmi. Neki od njih, ω_c^a , ω_c^p i $k_o^{a,p}$, nisu eksperimentalno izmjereni i zapravo su odabrani unutar očekivanih vrijednosti tako da model daje smislene rezultate. Za računalnu implementaciju, sve vrijednosti su skalirane: frekvencije sa γ , duljine sa $l = 8\text{nm}$ (duljina tubulinskog dimera) i sile sa f_m .

U računalu su mikrotubuli implementirani preko niza zapisa, čije indeksirane komponente reprezentiraju vezivna mjesta na mikrotubulima. Svaki zapis sadržava informaciju da li je vezno mjesto prazno ili okupirano sa jednostrano ili dvostrano vezanim aktivnim ili pasivnim proteinom (u tom slučaju i kamo je privezan na drugom mikrotubulu). Osnova struktura programskog koda se sastoji od nekoliko glavnih koraka:

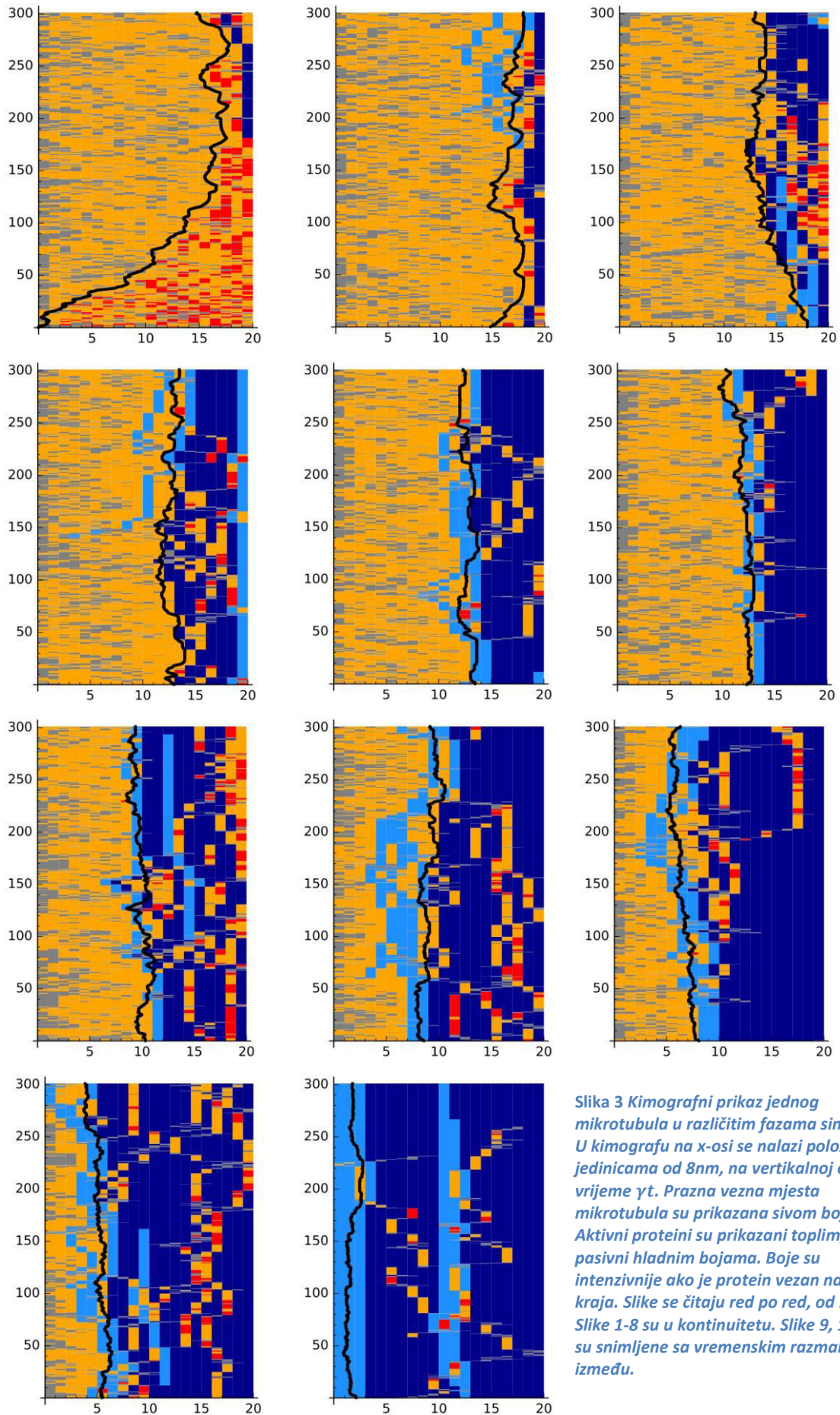
1. Inicijalizacija para mikrotubula (dva prazna antiparalelna mikrotubula posmaknuti za 0nm)
2. Prolaz po svim mjestima mikrotubula
 - a. Razmatranje koji se događaji mogu dogoditi sa zadanim mjestom
 - b. Slučajni odabir događaja sukladno njegovoj vjerojatnosti
 - c. Unošenje promjene u strukturu (implementaciju mikrotubula)
 - d. Prelazak na slijedeće vezivno mjesto
3. Izračun sile na pojedini mikrotubl i njegova pomaka pomoću Hookova zakona
4. Ispis stanja mikrotubula u tekstualnu datoteku
5. Ukoliko nije prošao predviđen broj iteracija, povratak na 2. točku, ukoliko je izlaz iz petlje ispis glavnih podataka na konzolu programa.

Kroz samu implementaciju dopisivane su i mnoge dodatne funkcije koje bi upozorile ako bi se program dvoumio oko dva događaja na jednom mikrotubularnom mjestu, ili ako bi trebalo učiniti vidljivim koliko je bilo događaja pojedinog tipa. Na taj način su se mogli prilagoditi parametri tako da loših događaja bude što manje (manje od 1 na 100 000), i da dinamika bude što životnija. Dobivena tekstualna datoteka se mogla koristiti kao izvor nove inicijalizacije mikrotubula, tako da se jednom prekinuta evolucija sustava mogla nastaviti u slijedećem pokretanju programa.

Podatci iz tekstualne datoteke grafički su prikazani pomoću kimografa. Na kimografu horizontalna os prikazuje poziciju vezinog mjesta x/l , a vertikalna os vrijeme u skaliranom obliku γt . Sadržaj veznog mjesta u svakom trenutku je označen sa bojom. Na kimograf doctrana je pozicija pozicija (+) kraja drugog mikrotubula.

Rezultati i rasprava

Dobiveni su rezultati prikazani na kimografima sa slike 3. Korišteni parametri su navedeni u tablici 2. Na slikama se redom vidi kako se razvija iterdigitacija mikrotubula. U početnim trenutcima se vidi da je promatrani mikrotubul praznih vezivnih mjesta. Ubrzo nakon toga vezuju se aktivni proteini sa jednim krajem, prvenstveno zato jer im je frekvencija vezivanja tisuću puta veća od frekvencije vezivanja pasivnih linkera. Nakon toga linkeri se homogeno distribuirano povezuju na drugi



Slika 3 Kimografski prikaz jednog mikrotubula u različitim fazama simulacije. U kimografu na x-osi se nalazi položaj u jedinicama od 8nm, na vertikalnoj osi vrijeme γt . Prazna vezna mjesta mikrotubula su prikazana sivom bojom. Aktivni proteini su prikazani toplim, a pasivni hladnim bojama. Boje su intenzivnije ako je protein vezan na oba kraja. Slike se čitaju red po red, od 1-11. Slike 9, 10 i 11 su snimljene sa vremenskim razmakom između.

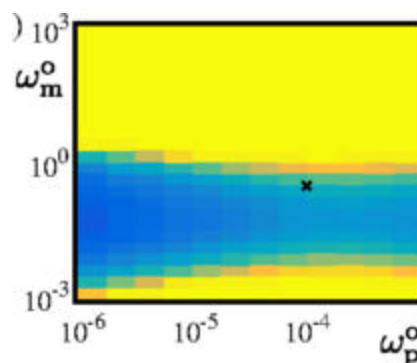
mikrotubul, što je indicirano pojavom crvenih traka u preklopu između dva mikrotubula. Kroz čitavo vrijeme proteini se spontano odvezuju i ponovo vezuju za mikrotubule što ostavlja na nekoliko trenutaka prazna mjesta kamo mogu preskočiti dvostruko vezani proteini. Na taj način preklapanje između dva mikrotubula se počinje smanjivati djelovanjem aktivnih proteina. Djelovanje aktivnih proteina je to veće što je veći preklap pošto tada ima najviše mjesta i šanse da se ostvari obostrano vezivanje linkera između mikrotubula. To je vidljivo na slikama 2-3 gdje posmak mikrotubula počne oscilirati oko vrijednosti 15. U tome stanju je mikrotubul duže vremena i na taj način raste vjerojatnost da se na mikrotubul veže pasivni protein. Pasivni proteini su paramterizirani jako niskim vjerojatnostima vezivanja i odvezivanja sa mikrotubula, što dovodi do toga da kad se jednom vežu vrlo je malo vjerojatno da dođe do odvezivanja. Također vezani pasivni linkeri imaju sposobnost difuzivnog drifta dužinom mikrotubula (hopping) i tako mogu naići na rub drugog mikrotubula i vezivati se na njega. Kad se vežu također ispoljavaju silu, u ovom slučaju onu koja smanjuje posmak dva mikrotubula. Razlog tome je upravo spomenut: zbog difuzivnog hoppinga glava jednog pasivnog linkera se u konačnici odvezala i zavezala za slobodniji dio mikrotubula i tako generirala suprotstavljenu silu. Također, sterička smetnja ostalih pasivnih mikrotubula na (+) kraju mikrotubula ne dozvoljava da pasivni linkeri skaču prema plus kraju nego uvjetuje širenje u područja ispunjena aktivnim proteinima s puno bržom pregradnjom. Na daljnjim slikama se vidi da se scenarij ponavlja i kako pasivni linkeri hoppaju prema (-) kraju mikrotubula, tako se oslobađaju nova mjesta za vezivanje aktivnih linkera. Sa vremenom i ta mjesta okupiraju pasivni linkeri koji učvršćuju stanje i predviđenim mehanizmom smanjuju posmak mikrotubula. U konačnici, svi mikrotubuli dolaze na apsolutni preklap, kao na početku, a sva vezna mjesta su većinom okupirana sa pasivnim proteinima.

U radu [8], ipak se to pokazuje kao točnim samo u određenim slučajevima, kako je prikazano na slici 4. U velikom dijelu toga faznog dijagrama stabilni preklopi su oko 50% duljine mikrotubula. Zaključak toga rada je da, kao što je i gore pokazano na indirektan način, aktivni linkeri povećavaju posmak mikrotubula proporcionalno duljini preklopa, a pasivni linkeri povećavaju preklap mikrotubula neovisno o posmaku. Prema njihovom proračunu i simulaciji do toga dolazi zbog asimetričnog vezivanja na rubovima mikrotubula. Kako su u srednini preklopa mikrotubula pasivni linkeri nasumično usmjereni, dolazi do poništavanja njihovog djelovanja. Na rubovima oni pasivni linkeri koji krenu sa ruba mikrotubula i vežu se na ne preklapljeni bulk drugog mikrotubula nemaju lokalnog antagonista, a efekti oba ruba djeluju sinergistički i tako se razvija sila koja teži većem preklapanju mikrotubula.

Takav efekt se u mojoj simulaciji mogao samo malo zamjetiti prvenstveno zato što su modelirani mikrotubuli bili dugački samo 20 veznih mjesta, pa nije moglo doći do jake suprotstavljenje sile od onih aktivnih dvostruko vezanih proteina koji bi se mogli vezati u trenutcima kada zbog difuzije pasivnih linkera se oslobode slobodna mjesta unutar preklopa mikrotubula.

Zaključak

Iz izvedene simulacije vremenske evolucije preklopa dva mikrotubula može se zaključiti da postoje dvije vremenske skale na osnovu kojih se ponašaju kratki mikrotubularni filamenti. Dugačka vremenska skala odnosi se na dinamiku distribucije pasivnih linker proteina, a kratka na aktivne linker



Slika 4 Prikaz stabilnog posmaka u ovisnosti o iznosu slobodnih parametara modela. U području plave boje preklap je oko 50%, u žutom području oko 100%. Crni križić predstavlja paramete odabrane u ovoj simulaciji i simulaciji u [8]. Slika je preuzeta iz [8] i služi samo za usporedbu jer duljine mikrotubula nisu bile jednake.

proteine. Aktivni proteini služe slično punilu događaja i nemaju prevelikog utjecaja na dinamiku mikrotubula u dugoročnom planu. Glavni razlog tome je činjenica da kod kratkih mikrotubula nema istaknutog združenog djelovanja.

Dodatak

Kod je dostupan na web adresi: <https://www.dropbox.com/s/vllyieazschpb6q/main.c?dl=0>

Literatura

- [1] *Stanica, molekularni pristup, treće izdanje; G.M. Cooper, R.E. Hausman; Medicinska naklada, Zagreb (2004)*
- [2] *Harperova ilustrirana biokemija, dvadesetosmo izdanje; R.K.Murray et al.; Medicinska naklada, Zagreb (2011)*
- [3] *Particle-based Stochastic Simulation in Systems Biology; D.P. Tolle, N. La Novere; Current Bioinformatics, 1, 000-000 (2006)*
- [4] *A Practical Guide to Stochastic Simulations of Reaction-Diffusion processes; R. Erban, S.J. Chapman, P.K. Maini; arxiv.org (2007)*
- [5] *A Practical Guide to Computer Simulations; A.K. Hartmann, E. Rieger; arxiv.org (2008)*
- [6] *Stochastic Simulation in Systems Biology; T. Sezekly Jr., K. Burrage; Computational and Structural Biotechnology Journal, 12, 14-25 (2014)*
- [7] *Exact Stochastic Simulations of Intracellular Transport by Mechanically Coupled Molecular Motors; J.A. Helmuth, S. Reboux, I.F. Sbalzarini; Journal of Computational Science, 2, 324-334 (2011)*
- [8] *Generation of Stable Overlaps between Antiparallel Filaments; D. Johann, D. Goswami, K. Kruse; Physical Review Letters, 115, 118103 (2015)*