

dc_11_10

Sugár István

SEJT- ÉS LIPID MEMBRÁN STRUKTÚRÁK.
AZ ELEKTROMOS-, TERMÁLIS- ÉS KÉMIAI KÖLCSÖNHATÁSOK SZEREPE.

Doktori értekezés tézisei

New York, 2010

1. A kutatások előzményei

A sejt membrán (plazma membrán) elválasztja a sejt belsejét a sejten kívüli környezettől, és kontrollálja a molekulák ki- és beáramlását. A sejt membránokat alkotó fehérje- és lipid molekuláknak fontos szerepük van a sejtekkel kapcsolatos folyamatokban, mint például sejt adhézió, ion csatorna vezetőképesség és sejtek közti kommunikáció.

A sejtmembrán szerkezetének alapja a bi-molekuláris lipid réteg, amelyet több száz fajta lipid molekula alkot. A bi-molekuláris rétegben a lipid molekulák hidrofíl fej csoportjai a membrán belső és külső felületét alkotják, mely felületek a sejten belüli illetve kívüli vizes oldattal érintkeznek. Másrészt a lipid molekulák hidrofób hidrokarbon láncai a membrán belsejét alkotják. Ebben a lipid mátrixban “úsznak” a felületi- vagy integrális membrán fehérjék, amelyek részben vagy teljesen “belemerülnek” a lipid rétegbe.

A sejt membránok funkcionális jelentősége miatt a 60-as évek végén megkezdődött a membránok szerkezetének széleskörű kutatása. Annak érdekében, hogy a fizika struktúrameghatározó módszereit hatékonyan alkalmazni lehessen az egyszerű összetételű, lipid membránokat kezdték tanulmányozni. A lipid membránok egy- vagy kétfajta lipid molekulából épülnek fel és általában fehérjét nem tartalmaznak.

A kémiai szempontból egyszerű lipid membránok fizikai szempontból komplex rendszerek, amelyek külső körülmények hatására fázisátalakuláson mehetnek át és megváltozhat a komponensek membránon belüli eloszlása. Fizikában hasonló rendszereket vizsgálnak kísérletileg és elméletileg (condensed matter physics) egyaránt. A membrán biofizikában kiterjedten alkalmazott kísérleti módszerek a következők: kalorimetria (DSC), röntgen diffrakció, mag mágneses rezonancia (NMR), fluoreszcens spektroszkópia, és FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Az alkalmazott elméleti módszerek pedig felhasználják a statisztikus és determinisztikus fizika eszköztárát.

2. Célkritikázások

A sejt- vagy lipid membrán szerkezete meghatározza annak funkcióját. A külső körülmények megváltoztatása a membrán szerkezet és következésképp a funkciók megváltozásához vezethet. Kutatásunk célja, hogy e szerkezet-funkció kapcsolatot tanulmányozzuk a következő termodinamikai kölcsönhatások esetén: elektromos, termális és kémiai.

1972-ben Neumann és Rosenheck elsőként írta le lipid vezikulák elektromos tér hatására bekövetkező permeabilizálódását és a jelenséget elektroporációnak nevezték el. Az elektroporáció jelenségét Chizmadzhev és munkacsoportja értelmezte először a Bioelectrochemistry and Bioengineering-ben 1979-ben publikált cikksorozatukban. Professzor Neumann meghívására 1983 elején négy hónapot töltöttem a Max-Planck Intézetben, Martinsried/München-ben, hogy kidolgozzuk az elektroporáció elméletét. Egy a sztohasztikus folyamatok elméletén alapuló modell kifejlesztését tűztük ki célunk, amely egységesen magyarázza az elektroporáció jelenségeit: kritikus feszültség, stabil membránok reverzibilis elektroporációja, metastabil membránok élettartama valamint reverzibilis és irreverzibilis elektroporációja, a pórusképződés és pórus bezáródás kinetikája.

Felfedezésének pillanatában nyilvánvaló volt, hogy az elektroporáció segítségével idegen gének vagy gyógyszer molekulák vihetők be a sejtekbe, amit génsebészetben és biotechnológiában jól lehet alkalmazni. Azonban az erős elektromos tér által keltett Joule hő, a konvencionális elektroporátorokban, a sejtek 80%-át elpusztítja. 1992-ben fogadták el Robert Schmukler találmányát, az alacsony feszültségű elektroporátort (LVEP), amelyben a sejtek 100%-a túlélte az elektroporációt. Az LVEP mérési terét egy mikropórusokkal átjárt szűrőpapír két részre osztja. Hidrosztatikai nyomás segítségével a sejteket részlegesen a mikropórusokba nyomják, és 30 milliszekundumos alacsony

feszültségű teret kapcsolnak a rendszerre. Dr. Schmuklerrel 2000 elejétől működtem együtt, hogy az LVEP elméletét kidolgozzuk. Célul tűztük ki a Laplace egyenlet numerikus megoldását az LVEP komplikált geometriája mellett. Meghatározni kívántuk a sejtmembrán külső és belső felülete közötti potenciálkülönbséget a sejtfelület minden pontján, valamint a kialakuló pórusoknak a membránban való eloszlását. Ezen elmélet révén lehetőség nyílik az alkalmazandó minimális feszültség meghatározására, amely az LVEP-ben elektroporációra vezet.

Az egykomponensű lipid membránok hőmérséklet változás hatására bekövetkező gél-fluid fázisátalakulását Chapman és munkatársai 1967-ben kalorimetriás mérésekkel mutatták ki. Luzatti (1968) röntgen diffrakciós mérései szerint gél állapotban a szénhidrogén láncok transz konfigurációban vannak, míg fluid állapotban a láncok rotációs izomérek is tartalmazzak. 1973-ban Nagle Ising rácson modellezte a szénhidrogén láncokat és a gél-fluid fázisátalakulást. Nagle egyszerű membrán modellje zárt alakban megoldható volt. Ugyanezt a jelenséget napjainkban realiztikusabb, minden atomot figyelembevevő, modelleken tanulmányozzák a molekuláris dinamika vagy Monte Carlo módszerek segítségével. Több komponensű membránok esetén e realiztikus membrán modellek nem használhatók, mivel a molekulák membránon belüli diffúziója több nagyságrenddel lassúbb mint a lipid molekulákon belüli mozgások. A kétkomponensű lipid membránokat először Landau fenomenologikus elméletének felhasználásával modelleztem (Sugár és Monticelli, 1985) A modell segítségével kiszámolhatóak voltak a fázisdiagrammok különböző lánchosszúságú és fejcsoportú lipid komponensek esetén, azonban a modell nem adott információt a komponensek membránon belüli eloszlására. 1983-tól 1987-ig Thompson és Biltonen professzorok meghívására a Virginiai Egyetem Biokémiai Tanszékén dolgoztam, ahol célul tűztük ki kétkomponensű lipid membránok Ising rácson való modellezését. Monte Carlo módszerek alkalmazásával tanulmányozni szerettük volna a különböző komponensek valamint a gél és fluid fázisú molekulák membránon belüli eloszlását: a domének számát, méreteloszlását és perkolációs tulajdonságait, valamint a komponensek laterális diffúzióját és a membrán permeabilitását különböző keverési arányok esetén.

2000 tájékán Brockman professzor, a Minnesotai Egyetemhez tartozó Hormel Intézet kutatója, egy felületi fehérje, a kolipáz egyrétegű lipid membránokon való adszorpcióját vizsgálta. Kimutatta, hogy az adszorpció függ a két lipidkomponens: foszfolipid és diacilglicerol, keverési arányától valamint a membránra gyakorolt oldalnyomástól. 2001-ben kezdtem együttműködésemet Brockman professzorral. Célunk az volt, hogy a fenti mérési eredményeket a membrán komponensek eloszlásában bekövetkező változással hozzuk kapcsolatba.

2007-ben figyelmemet Berezhkovskii és munkatársai cikke keltette fel, amely 2004-ben a Biophysical Chemistry-ben jelent meg. Hámsejtek (epithelial cells) rétegét modellezték egy sikkal, amely egy ponton molekulát bocsájt ki. A molekula diffundál a setek felületét borító vékony folyadék rétegben, addig amíg valahol a sejtek felületén a molekula adszorpciója be nem következik. Berezhkovskii-ék az időfüggő homogén diffúziós egyenlet analitikus megoldásával meghatározták a kibocsájtott molekula elnyelődési helyének az eloszlásfüggvényét. Céлом a Berezhkovskii féle modell tovább fejlesztése volt. E modellben figyelembe kívántam venni a hámsejtek felületén található mikrovillusokat. A mikrovillusok a plazma membrán kitüremkedései. Hosszuk 0.5-1.5 μm míg átmérőjük 0.1-0.2 μm . Számuk a hámsejtek rétegének típusától függ. Az alveoláris sejteken például kb. 120-140 mikrovillus található. Eredetileg úgy gondoltam, hogy az adszorpció helyének eloszlása erősen függ attól, hogy a molekula egy mikrovillus csúcsán vagy oldalán kerül-e kibocsájtásra. Elképzelésem szerint a mikrovillus oldalán kibocsájtott molekulát nagy valószínűséggel a közvetlenül mellette lévő mikrovillusok egyike fogja adszorbeálni, s így a paracrine signaling valószínűségét a mikrovillusok jelenléte erősen befolyásolja.

3. Új tudományos eredmények

1. A sejtek elektroporációjának sztohasztikus modellje

1.1

A társszerzővel (Neumann) együttműködésben kifejlesztettem a membránban kialakuló pórusok ún. periódikus blokk modelljét [1]. A modellben a pórus fal molekuláris szerkezete minimalizálja a lipid molekulák hidrofób láncainak vízzel való direkt kölcsönhatását. E modell az elektroporáció értelmezésének alapjául szolgált. A későbbiekben a periódikus blokk modellt továbbfejlesztettem (Försterrel és Neumannal együttműködésben) [2], annak érdekében, hogy a sejt membránok elektrofúzióját értelmezzem.

1.2

A pórus periódikus blokk modelljét feltételezve meghatároztam a membrán szabad energiáját és felírtam az elektroporáció Master egyenletét [1]. Később megmutattam, hogy hasonló Master egyenletre juthatunk a nélkül, hogy ismernénk a pórus fal molekuláris szintű szerkezetét [3]. A Master egyenletet vizsgálva értelmeztem az elektroporáció kritikus feszültségét, a reverzibilis és irreverzibilis elektroporáció jelenségét metastabilis membránok esetén.

1.3

Feltételezve, hogy az elektroporáció egy Poisson folyamat, numerikusan megoldottam a Master egyenletet [1], azaz kiszámoltam a pórus kinyílás és bezáródás időfüggését különböző erősségű elektromos terek jelenlétében.

1.4

Megmutattam, hogy az átlagos idő, amely alatt a pórus rádiusz zéróról egy adott R értékre növekszik (first passage time - fpt) analitikusan megadható [3]. Ezt az analitikus megoldást vizsgáltuk mind stabilis mind pedig metastabilis membránok esetén különböző erősségű elektromos terek jelenlétében.

2. Az alacsony feszültségű elektroporátor fenomenologikus modellje

2.1

Megmutattam, hogy az alacsony feszültségű elektroporátor hasonló egységek együttesének tekinthető [4]. Az egységek száma megegyezik a szűrőpapír mikropórusainak számával. Feltételeztem, hogy minden egyes mikropórusban egy sejt van beszorítva, míg a szűrőpapír alatti és feletti folyadéktérben nincs sejt. Megadtam a mikropórusba szorított sejt geometriáját és felírtam egyetlen egységre vonatkozóan a Laplace egyenletet, az összes határfeltételekkel együtt.

2.2

Mivel az egységek tengelyszimmetrikusak a két dimenziós Laplace egyenlet megoldható volt a Matlab program csomag segítségével (Partial Differential Equations Toolbox). Az elektrosztatikus probléma megoldásából meghatároztam a sejtmembrán minden pontjában a transzmembrán feszültséget. Mivel a pórusképződés valószínűsége arányos ezzel a feszültséggel, így következtetni tudtam a membránbeli póruseloszlásra. Kiszámoltam továbbá az elektroporátorra adható minimális feszültséget, amely már elektroporációt okoz. Definiáltam az elektroporáció hatékonyságát, mint a sejtfelület azon hányadát, ahol pórusok kialakulhatnak. Összehasonlítottam a magas- és alacsony feszültségű elektroporátorok hatékonyságát.

2.3

A mikropórusokban az áramsűrűség több ezerszerese a szűrőpapír alatti és feletti térrészben mérhető áramsűrűségnek. Kiszámoltam az alacsony feszültségű elektroporátor mikropórusaiban a feszültségimpulzus hatására bekövetkező hőképződést és a hő disszipációját a szűrőpapír alatti és feletti térrészbe. Kimutattam, hogy a disszipáció időállandója század része a 30 milliszekundumos pulzusszélességnek. A gyors disszipáció miatt a mikropórusba szorított sejt belseje nem képes felmelegedni és így a sejtek túlélnek az elektroporációt. Ezzel szemben magasfeszültségű elektroporátorokban az áramsűrűség az extracelluláris térben mindenütt magas. Nincs mód a Joule hő gyors disszipációjára, és a sejtek felmelegednek. Ezért a sejteknek csak 10-20%-a éli túl a kezelést.

3. Kétkomponensű lipid membránok modellezése

3.1

A társszerzőkkel együttműködésben Monte Carlo módszereket használva, egy- és kétkomponensű membránokat szimuláltam [5,6]. A membránt két dimenziós Ising rácson modelleztem, amelyben minden egyes rácspont egy lipid molekula hidrokarbon láncát reprezentálja, míg két szomszédos rácspont az egész lipid molekulának felel meg (dimér modell). Egy rácspont négy állapotban lehet: 1) gél állapotú lánc az 1-es komponensnek, 2) gél állapotú lánc a 2-es komponensnek, 3) fluid állapotú lánc az 1-es komponensnek, és 4) fluid állapotú lánc a 2-es komponensnek. A dimér modell csak első szomszéd kölcsönhatást vesz figyelembe a rácspontok között, amelynek erőssége a kölcsönható rácspontok állapotától függ. A kölcsönhatási energiákat sikerült úgy meghatároznom, hogy a DMPC/DSPC foszfolipid keverékekre számolt kalorimetriás görbék (fajhő a hőmérséklet függvényében) megegyeztek a különböző keverési arányoknál mért görbékkel.

3.2

A dimér modellből számolt energiaeloszlás görbe analiziséből arra következtettem, hogy a két-komponensű membrán gél-fluid átalakulása nem első-rendű fázisátalakulás, hanem úgynevezett folyamatos átalakulás.

3.3

Összehasonlítottam a DMPC/DSPC keverékek termodinamikai tulajdonságait a konfigurációs tulajdonságokkal. A konfigurációs változásokra jellemző hőmérsékletek jól korreláltak a hőkapacitás görbék lokális maximumaival, és nem e görbék kezdeti és véghőmérsékletével

3.4

A FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) mérésekből, különböző keverési arányoknál, meghatározott kritikus hőmérsékleteket kapcsolatba lehetett hozni a gél állapotú domének perkolációs hőmérsékleteivel. Érdekes módon a gél (fluid) domének perkolációs frekvenciája független a gél (fluid) doméneken belüli keverési aránytól.

3.5

Sikerült kimutatnom, hogy a komponensek nem egyenletesen oszlanak el a gél (fluid) doméneken belül.

3.6

Az egyszerű dimér modell segítségével tanulmányozhattam a komponensek öndiffúzióját különböző hőmérsékletek és keverési arányok esetén [7]. Kimutattam, hogy gél-gél és gél-fluid keverék fázisok esetén a komponensek diffúziója anomális (sub-diffusion), míg tiszta gél és tiszta fluid fázisokban normális. A szimulációk az NMR mérésekkel egyezően azt mutatták, hogy a diffúziós állandó a gél-fluid fázisban folytonosan csökken a hőmérséklet csökkenésével.

3.7

Doktoranduszommal, Ekaterina Michonova-Alexová-val, együttműködésben meghatároztam a gél és fluid domének méret szerinti eloszlását különböző hőmérsékleten és keverési arányoknál [8]. Tanulmányoztam a domének átlagos geometriai tulajdonságait [9], amikor gél és fluid domének együttesen vannak jelen a membránban: a gél/fluid domének fraktál dimenzióját, a DSPC kompozíciós domének egymástól való átlagos távolságát, a doméneken található belső szigetek számát és méretét. Vizsgáltam a kompozíciós domének méret szerinti eloszlását [10]. Adott hőmérsékleten, alacsony keverési arányoknál sok kis domén van jelen (a nanométer mérettartományban), amelyek méreteloszlása unimodális. Egy kritikus keverési arány fölött azonban a méreteloszlás bimodálissá válik: a kis domének mellett megjelenik egy nagy domén. E kritikus keverési arányokat a hőmérséklet függvényében ábrázolva egy új típusú diagramját alkottam meg

a két-komponensű lipid membránoknak, amely a kompozíciós domének tulajdonságait jellemzi.

3.8

A membrán modellek egy másik csoportját alkotják a Mouritsen-féle monomer modellek, ahol ugyancsak minden egyes rácspont egy lipid molekula hidrokarbon láncát reprezentálja, de az egy lipid molekulához tartozó láncoknak megfelelő rácspontok akármilyen távol lehetnek egymástól. Összehasonlítottam a dimér és monomér membrán modelleket [11]. Kimutattam, hogy tisztán gél vagy tisztán fluid fázisok esetén mindkét modell a kompozíciós doménekre a következő négy topológiát eredményezi: i) ágas-bogas, ii) kör alakú, iii) sáv alakú, és iv) sík szerű. Azonban azonos domén méret és kölcsönhatási energiák esetén a dimér modell adta domének kompaktabbak (azaz a *külső terület/domén méret* arány kisebb) mint a monomér modell adta domének. A különbségek abból adódnak, hogy a dimér modell esetében a keverési entrópia alacsonyabb és a legkisebb méretű belső sziget kialakításához nagyobb energia szükséges.

3.9

A dimér modell segítségével kimutattam [12], hogy a membránok permeabilitását értelmező két elképzelés: a fázishatár modell és a felületi fluktuációs modell, kvalitatív különböző permeabilitási görbékre vezet. Például 50%-os DMPC/DSPC keverési aránynál a permeabilitási görbének egy maximuma van a fázishatár model szerint és két lokális maximuma a felületi fluktuációs modell esetén. Hogy melyik permeabilitási modell a korrekt ezt csak a permeabilitási görbe mérésével lehet majd eldönteni.

4. Fehérje – membrán kölcsönhatás modellezése

4.1

Howard Brockman professzorral (University of Minnesota) együttműködésben tanulmányoztam a kolipáz adszorpcióját diacilglicerol/foszfolipid keverékből készült

egyrétegű membránokon [13-16]. Kimutattam, hogy az adszorpció akkor történhet meg, amikor egy kritikusnál nagyobb hidrofób terület alakul ki a membrán felületén. Egyrészt szabad diacilglicerol molekulák, amelyek nem alkotnak komplexet foszfolipid molekulákkal, aggregációja eredményezhet ilyen felületet, mivel ezen molekulák fejcsoportja hidrofób. Másrészt, ha a membrán molekulái nem szorosan pakoltak, a membrán felületén megjelenő hidrokarbon láncok alkotják a kellő méretű hidrofób felületet. A fent említett két lehetőséget leíró modellt 2001-ben illetve 2005-ben közzétettük a Biophysical Journal-ban [13,15]. Végül 2007-ben a Journal of Physical Chemistry B-ben publikált cikkünkben egy egységes modellt tárgyalunk [16], ahol a kritikus hidrofób felületet diacilglicerol aggregátumok és a felületen megjelenő hidrokarbon láncok együttesen hozhatják létre.

5. Hámsejtek közötti kémiai kölcsönhatás modellezése

5.1

Baktériumok és vírusok hatására a sejtek molekulákat bocsájtanak ki, amelyeket vagy a kibocsájtó sejt (autocrine signaling) vagy egy másik környező sejt adszorbeál (paracrine signaling). A kibocsájtó sejtek ily módon ellenőrzik, hogy környezetükben történt-e változás. Stuart Sealfon professzorral együttműködésben kidolgoztam a hámsejtek alkotta felület egy realisztikus modelljét és tanulmányoztam a mikrovillusok pakoltságának hatását az autocrine/paracrine signaling valószínűségére [17]. Előzetesen úgy képzeltem, hogy a microvillus oldalán kibocsájtott molekulát nagy valószínűséggel a közvetlenül mellette lévő mikrovillusok egyike fogja adszorbeálni, s így a paracrine signaling valószínűségét a mikrovillusok jelenléte erősen befolyásolja. A molekulák diffúzióját leíró parciális differenciál egyenletet numerikusan oldottam meg. Kimutattam, hogy a sejtek közötti kémiai kommunikáció hatékonyan szabályozható azáltal, hogy a mikrovillusok milyen szorosan pakoltak. A modell eredménye szerint a kommunikáció intenzitása 30%-al növekszik ha a szorosan pakolt mikrovillusok átmérője csak 2%-al csökken, azaz a pakolás kissé lazább lesz. A sejtek képesek a mikrovillusok geometriáját megváltoztatni, mivel minden microvillusban egy-egy köteg aktin lánc húzódik.

4. A tézispontokhoz kapcsolódó tudományos közlemények

- [1] Sugar, I.P., Neumann, E. (1984) Stochastic model for electric field-induced membrane pores. Electroporation. ***Biophys.Chem.*** 19, 211-225.

- [2] Sugar, I.P., Forster, W., Neumann, E. (1987) Model of cell electrofusion: Membrane electroporation, pore coalescence and percolation. ***Biophys.Chem.*** 26, 321-335.

- [3] Sugar, I.P. (1989) Stochastic model for electric field-induced membrane pores. ***In:*** Electroporation and electrofusion in cell Biology, Eds: N. Neumann, A. Sowers, and C. Jordan, Plenum Publishing Corporation, pp. 97-110.

- [4] Sugar, I.P., Lindesay, J., Schmukler, R.E. (2003) Phenomenological theory of low-voltage electroporation. Electric field calculation. ***J.Phys.Chem.B***, 107:3862-3870.

- [5] Sugar, I.P., Biltonen, R.L., Mitchard, N. (1994) Monte Carlo simulations of membranes: The phase transition of small unilamellar DPPC vesicles. ***Methods in Enzymology*** 240, 569-593.

- [6] Sugar, I.P., Thompson, T.E., Biltonen, R.L. (1999) Monte Carlo simulation of two-component bilayers: DMPC/DSPC mixtures. ***Biophys. J.*** 76, 2099-2110.

- [7] Sugar, I.P., Biltonen, R.L. (2005) Lateral diffusion of molecules in two-component lipid bilayer. A Monte Carlo simulation study. ***J.Phys. Chem. B.*** 109: 7373-7386.

- [8] Michonova-Alexova, E.I., Sugar, I.P. (2001) Size distribution of gel and fluid clusters in DMPC/DSPC lipid bilayers. A Monte Carlo simulation study. ***J.Phys.Chem.B*** 105, 10076-10083.

- [9] Sugar, I.P., Michonova-Alexova, E., Chong, P.L.-G. (2001) Geometrical properties of gel and fluid clusters in DMPC/DSPC bilayers: Monte Carlo simulation approach using a

two-state model. ***Biophys. J.*** 81, 2425-2441.

[10] Michonova-Alexova, E.I., Sugar, I.P. (2002) Component and phase separation in DMPC/DSPC lipid bilayers: A Monte Carlo simulation study. ***Biophys. J.***, 83:1820-1833.

[11] Sugar, I.P. (2008) On the inner structure and topology of clusters in two-component lipid bilayers. Comparison of monomer and dimer Ising models. ***J. Phys. Chem. B.*** 112, 11631-11642.

[12] Sugar, I.P., Biltonen, R.L. (2000) Structure-function relationships in two-component phospholipid bilayers. A Monte Carlo simulation approach using a two state model. ***Methods in Enzymology***, Eds.G.K. Ackers and M.L. Johnson, Academic Press, 323, 340-372.

[13] Sugar, I.P., Mizuno, N.K., Momsen, M.M., Brockman, H.L. (2001) Lipid lateral organization in fluid interfaces controls the rate of colipase association. ***Biophys. J.*** 81, 3387-3397.

[14] Sugar, I.P., Mizuno, N.K., Momsen, M.M., Momsen, W.E., Brockman, H.L. (2003) Regulation of lipases by lipid-lipid interactions: implications for lipid-mediated signaling in cells. ***Chem.Phys.Lipids***, 122, 53-64.

[15] Sugar, I.P., Mizuno, N.K., Brockman, H.L. (2005) Peripheral protein adsorption to lipid monolayers. The free area theory. ***Biophys. J.*** 89, 3997-4005.

[16] Sugar, I.P., Brockman, H.L. (2007) Model of peripheral protein adsorption on water/lipid interface. ***J. Phys. Chem. B.*** 111, 4073-4081.

[17] Sugár, I.P., Sealfon, S.C. (2009) Model of autocrine/paracrine signaling in epithelial layer: Geometrical regulation of intercellular communication. ***J. Phys. Chem. B.*** 113,

dc_11_10

10946-10956.