

Sugár István „Sejt- és lipid membrán struktúrák. Az elektromos-, termális-, és kémiai kölcsönhatások szerepe” című nagydoktori értekezésének véleményezése

Sugár István nagydoktori értekezésének középpontjában a sejtmembrán „bizonyos alkotóelemeinek” klaszterei állnak, legyen szó akár az elektromos tér által indukált pórusok (elektropórusok) klasztereiről (1.-2. tézisek), akár a lipid doménekről (3. tézis), akár a pedig a periferiális fehérjék kihorgonyzását szabályozó apoláris lipid klaszterekről (4. tézis), akár pedig a sejtek érzékelésért felelős mikrovillusok klasztereiről (5. tézis). Az értekezés célja a fenti klaszterek mérési eredményeken nyugvó elméleti fizikai (statisztikus fizikai) leírása. A feladat összetettségének megfelelően amíg az elektroporációs, jeltátviteli és bioérzéklési problémák analitikusan aránylag jól kezelhetők, addig a lipid domének generálásához már szofisztikált komputeres modellezésre van szükség.

Az értekezéshez felhasznált saját cikkek közül több foglalkozik a sejtmembrán molekula klasztereinek, elsősorban a lipid-klaszterek keletkezésének és szerkezetének kísérletileg meghatározható paramétereken (pl. a differenciális szkennning kalorimetriás entalpia adatok) nyugvó statisztikus fizikai leírásával, modellezésével. A kísérletileg meghatározható termodinamikai paraméterek analitikai módszerekkel történő származtatása, a különböző sűrűségvüggvények időfejlődésének explicit függvényekkel történő megadása azonban sokmolekulás kölcsönható rendszerekre szinte lehetetlen, ez idokolja a Monte Carlo módszerek széleskörű alkalmazását az értekezésben. Bár a modellezés fő célja a kísérletileg már megismert jelenségek magyarázatának a megtalálása, feladatát akkor tölti be igazán ha a már ismert jelenségeken túlmenőleg új jelenségek, törvényszerűségek létezését is képes előre megjósolni. Véleményezésemet ezt szem előtt tartva igyekeztem felépíteni.

1. A sejtek elektroporációjának sztochasztikus modellje

A téma gyakorlati fontosságát kiemeli, hogy manapság az elektroporátor a géntranszfekeciót alkalmazó biológiai laboratóriumok nélkülözhetetlen kellékévé vált. A szerző kifejlesztette a membrán pórusok ún. „periódikus blokk” modelljét, mely alapján analitikusan kiszámolta a pórusok szabadenergiáját a pórusméret és az elektromos tér függvényében. A szabadenergia megadása pedig lehetővé tette a pórusméret időfüggésének meghatározását ha a pórus különböző állapotait egy Markov-lánc elemeinek tekintjük. Ezen témakör fő eredményei hogy sikerült értelmezni az elektroporáció küszöbfeszültségét, a reverzibilis és irreverzibilis („dielektromos letörés”) elektroporáció jelenségét, valamint sikerült megadni a pórus kinyílás és bezáródás időfüggését különböző erősségű elektromos terek jelenlétében. Kiemelkedően fontos eredménynek tartom, hogy a szerző a „periódikus blokk” modell továbbfejlesztésével megmagyarázta a sejtek elektrofúzióját, valamint sikerült a matematikai leírást úgy általánosítani, hogy ne legyen szükség a pórusfal molekuláris felépítésének ismeretére. Ezzel lehetővé tette a kifejlesztett elmélet más területeken (pl. elektromos terek hatása emberi szövetekre) való alkalmazhatóságát is.

2. Az alacsony feszültségű elektroporátor (LVEP) fenomenologikus modellje

Ez az elrendezés a sejtek közvetlen közelében tapasztalható lokális áramsűrűség az elektromos ellenállás térbeli modulációja révén elért nagymértékű (1000-szeres) felerősítésén

alapszik. Az ellenállás lokális modulációját a sejtek alkalmas szigetelő anyagból készült szűrő mikrométeres pórusaiba való „beterelésével” érik el. Ennek, s továbbá a sejtek megnyúlásának hatására relatíve kis feszültségértékek (25 V szemben a hagyományos elektroporátor 150-700 V feszültségével) mellett is megvalósul az elektroporáció jelensége (a sejtek közvetlen közelében a feszültség értéke nagymértékben csökken lineárisan). Ezen elrendezés nagy előnye a hagyományos elektroporátorral szemben, hogy a sejtek túlnyomó többsége túléli a transzfekciót (98% és 10-20% túlélési hányadok) a lokálisan képződött Joule-féle hő gyors disszipációja (300 μ s) következtében. A szerző a Poisson-egyenlet analitikus megoldása révén megadja az elektromos tér profilját a mikropórusokba helyezett sejtek környezetében, valamint a képződött elektropórusok sejt felszíni eloszlását az alkalmazott feszültség és sejtelhelyezkedés, sejtalak függvényében.

3. Kétkomponensű lipid membránok modellezése

Ezen munka biológiai jelentőségét kiemeli az a tény, hogy a lipid klaszterek alapvető szervezői a sejtmembránon keresztüli jelátviteli folyamatoknak, a különféle lipid-raftok kiindulási alapjául szolgálnak. A szerző Monte Carlo szimulációs Ising-modell segítségével vizsgálta az egy és kétkomponensű lipid klaszterek szerveződését, azok viselkedését a fázisátalakulási pontok környékén. A modellezés bemenő paramétereiként szolgáló kölcsönhatási energiákat azon feltételből határozta meg, hogy a modellezés révén kapott kalorimetriás görbék (fajhő a hőmérséklet függvényében) egyezzenek meg a tapasztalati görbékkel. Meghatározta továbbá a lipid klaszterek geometriai jellemzőit: gél és folyékony domének méreteloszlása a hőmérséklet és összetétel függvényében, a domének fraktál dimenziója, élhossza, a domének átlagtávolsága, a doménekben található belső szigetek száma, méreteloszlása. A kompozíciós domének méret szerinti eloszlását illetően megállapítja, hogy míg kis keverési arányoknál adott hőmérsékleten sok kis domén van jelen a nm-es mérettartományban, azaz a méreteloszlás unimodális (ezek a domének lényegében az „egy-molekula nyomkövetési módszerrel”, SPT, nemrégiben felfedezett ún. „átmenetileg korlátozott lipid zónáknak” felelnek meg, TCZ, STALL), addig egy bizonyos kritikus keverési arány (perkolációs küszöb) felett a méreteloszlás bimodálissá válik, azaz megjelenik egy nagy domén, melynek mérete összemérhető a membrán méretével. E kritikus keverési arányokat a hőmérséklet függvényében ábrázolva megalkotja a kétkomponensű lipid membránok egy a kompozíciós domének tulajdonságait tükröző új típusú diagramját. A jelátviteli folyamatokat illetően a munkának különösen nagy jelentősége van abból a szempontból, hogy felhívja a figyelmet arra a jelenségre, hogy a lipid domének az egyes perkolációs küszöbök környékén a membránon-keresztüli jelátviteli folyamatok számára mindegy gyors kapcsolóként (relé) szolgálhatnak, hiszen a kisméretű töredezett lipid domének receptorfehérjékkel való kölcsönhatásformái lényegesen eltérnek a nagyméretű összefüggő lipid domének kölcsönhatásformáitól. Másrészt, felhívja a figyelmet arra is, hogy a különféle lipid domének eltérő élhosszal rendelkeznek, mely megszabja pl. a sejtmembránok eltérő permeabilitását, továbbá a domének határain végbemenő síkbeli kémiai reakciók (pl. immunreceptorok kicserélődése különböző lipid domének között) erősségeit és ezek drasztikusan megváltoznak a perkolációs küszöbök környékén. A lipid domének dimer és monomer modelljeit összehasonlítva megállapítja, hogy a dimer modell esetén a lipid klaszterek kompaktabbak

mint a monomer modell esetén, összhangban van a keverési entrópia kisebb értékével. Ezen eredmény útmutatóul szolgálhat pl. a több alegységből álló receptorok (pl. az MHCII molekula az dimer, az MHCI molekula az monomer) klasztereinek értelmezéséhez is.

4. Fehérje-membrán kölcsönhatás modellezése

Ez a tézis egy manapság nagyon forrónak számító területet érint: A ligand-receptor kötődés által kiváltott a citoplazmából a sejtmembránba irányuló fehérje transzlokációt. A leírt modell alapul szolgálhat számos membrán által elindított jelátviteli kaszkád értelmezéséhez. A szerző a kolipáz diacilglicerol (DAG) és foszfolipid keverékéből álló membránokhoz történő adszorpcióját írja le. A modell lényeges eleme, hogy a kolipáz csak a membrán fluktuációk révén megjelenő tranziens apoláros belső lipid zónákhoz ill. a foszfolipidek által nem kötött (le nem árnyékol) apoláros diacilglicerol molekulákhoz kötődhet. E modellben is lényeges szerephez jut a lipid domének perkolációs küszöb környéki viselkedése. A modell jóslata az, hogy a perifériális fehérje (kolipáz, PKC) számottevően csak akkor kötődik a membránhoz, hogyha az apoláros lipid komponens domén mérete eléri a perkolációs küszöböt.

5. Hámsejtek közötti kémiai kölcsönhatás modellezése

Az autokrin és parakrin érzékelési (jelátviteli) folyamatok modellezése a stacionárius inhomogén diffúziós egyenlet (Poisson) numerikus megoldása és az ú.n. „elnyelési hely eloszlás függvény” meghatározása révén. A modell alapfeltevése, hogy az érzékelés a ligand mikrovillusok révén történő kibocsájtása és elnyelése révén valósul meg. Az érzékelés autokrin, ha a kibocsájtó sejt köti meg saját ligandját, s parakrin, ha valamelyik szomszédos sejt köti meg azt. Ebben a jelenségben a mikrovillusok alkotta klaszterek játszik a fő szerepet: a parakrin jelátvitel akkor lesz domináns az autokrin jelátvitellel szemben ha a mikrovillusok klasztereinek tömörsége nem lép túl egy bizonyos határt. A mikrovillusok klasztereinek pakoltsága pedig a mikrovillusok keresztmetszetének aktív szabályozása révén befolyásolható az aktinfilamentumokon keresztül. A modell üzenete, hogy energiabefektetés (a citoskeletális mozgás) révén a sejt vagy baktérium képes az autokrin és parakrin érzékelési módok relatív súlyának a szabályozására (egyfajta adaptív szabályozási mód). A munka fontosságát kiemeli az, hogy a biológiai alapjelenség leírásán túlmenően, a modell alapul szolgálhat mesterséges bioérzékelők kifejlesztéséhez is.

Összefoglalva a fentiek (és a közlemények) alapján kijelenthető, hogy a nagydoktor jelölt által idézett munkák saját eredmények, azok hitelesek, továbbá a jelölt munkája révén jelentős új ismeretekkel gyarapította a tudományterületét (lipidológia). A kutatott területek mindegyike kivétel nélkül a mai membrán kutatás középpontjában áll. Megjegyzendő, továbbá, hogy a szűkebb értelemben vett tudományterületen kívül a jelölt magas szintű matematikai ismeretekről is tanúságot tett munkájában és az alkalmazott matematika iránt érdeklődők is számos jó példát találhatnak bizonyos matematikai diszciplinák úgymint a stochasztikus folyamatok, Markov-láncok, perkolációs elmélet, speciális függvények elméletének az alkalmazására. Negatívumként csak a disszertáció külalakja hozható fel: Sok esetben a grafikonok nem látszanak ill. nagyon el vannak mosódva, ami a bíráló dolgát igen megnehezítette ill. az adott ábrák tekintetében az eredeti forrás közleményekre volt utalva. Az értekezésből kimaradt az 50. és az 53. oldal. Ezen kívül sok az elírás. Ezekről eltekintve

azonban az értekezés nyelvezete és tartalma érthető. Javaslom az értekezés nyilvános vitára való kitűzését valamint az értekezés elfogadását.

Debrecen, 2011 június 28.

Tisztelettel,

Dr. Bene László

Kérdések a tézisekhez (az értekezés szakmai értékelését nem érintik, inkább a bíráló jobb megértését szolgálják).

A sejtek elektroporációjának sztochasztikus modellje:

1. Van-e összefüggés a lipid-domének „ágas-bogassága”, élhossza és a képződött elektropórusok száma között? Van-e olyan megfigyelésük, hogy az elektropórusok inkább a domének elválasztó határain képződnek? A membrán koleszterol tartalma (lipid-raft struktúra) befolyásolja-e az elektropórusok eloszlását?

Kétkomponensű lipid membránok modellezése:

2. A DMPC/DSPC kétkomponensű lipid keverék fázis-diagramjának Monte Carlo-Ising modellezése során kis rácsméretnél a lipid rács energia eloszlásának két csúcsa van (bimodális), mely egy csúcsúvá válik egy bizonyos küszöb rácsméret felett („finite size effect”, 2. ábra, I.P. Sugár *et al.*, Biophys. J. 1999. 76. 2099-2110). Mi az oka a két csúcs kialakulásának kis rácsméretknél? Mitől függ a méretküszöb értéke mely felett az energiaeloszlás unimodális?
3. Az értekezésben csak közvetlen-szomszéd kölcsönhatással számolt a Monte Carlo-Ising modellezés során. Az esetleges hosszútávú kölcsönhatások (ha ilyenek vannak) hogyan befolyásolják a lipid-domén struktúrákat?
4. A sejtek nyugalmi membránpotenciáljának (kb. -100 mV) lehet-e akkora hatása, hogy befolyásolni képes a lipid-domén struktúrákat? Elképzelhető-e, hogy egyetlen ioncsatorna (pl. feszültségvezérelte K^+ csatorna, mely képes a membránpotenciál befolyásolására), vagy ioncsatornák egy csoportjának koherens kinyílása a lipid-domén struktúra lokális (tranzien) átrendeződését idézheti elő?
5. A lipid-domének dimér modellje esetén a kedvezőtlenebb entrópiaprodukció miatt a lipid-klaszterek kompaktabbak mint a monomer modell esetén. Ez a megállapítás „átvihető-e” fehérje (immun receptor) klaszterekre (pl. az MHCII sejt felszíni antigének az α és β alegységek hetero-dimérjei, míg az MHCI antigének monomérek).

6. A FRAP mérésekből adódó küszöbhőmérsékletek inkább a gél állapotú lipid-domének perkolációs-küszöb hőmérsékleteivel korrelálnak semmint a folyékony doménekével. Ennek mi az oka?
7. A DSPC molarány a klaszter méret függvényében jellegzetesen változik. Nagyméretű gél klaszter esetén növekszik, kisméretű gél klaszter esetén pedig csökken, folyékony klaszterek esetén pedig ez a trend megfordul (9. ábra, I.P. Sugár *et al.*, Biophys. J. 1999. 76. 2099-2110). Mi a biológiai üzenete ennek a jelenségnek? Ez a jelenség kísérletileg valós biológiai rendszerekben tapasztalható-e? Ha a klasztereken „mélységanalízist” végeznek, akkor „folyékonysági gradienseket” (a DSPC molarány/”viszkozitás” változása a klaszter belseje felé haladva) észlelnek-e?

Fehérje-membrán kölcsönhatás modellezése:

8. A sejtek nyugalmi membránpotenciáljának lehet-e hatása a lipáz fehérje membránhoz történő kihorgonyzásához, azaz a membránpotenciál befolyásolhatja-e a periferiális fehérjék közreműködésével történő jelátviteli folyamatokat?
9. Az apoláris régiókhoz való kitapadás mellett a lipáz (vagy PKC) fehérjék membránhoz történő „kihorgonyzására” alternatív mechanizmust is javasoltak: amikor a periferiális fehérje egy kiálló magányos lipid-lánchoz („inverted non-lamellar L_e phase”) kötődik (Paavo K.J. Kinnunen, Chemistry and physics of lipids, 1996. 81. 151-166). Mennyire kell ezt a mechanizmust számításba venni?

Hámsejtek közötti kémiai kölcsönhatás modellezése:

10. A sejtek közti kommunikáció modellezése során figyelembe kellene-e még venni azt a körülményt, hogy a ligand esetleg nem rögtön találja meg a receptorát a membrán felszínén, hanem a kötődés előtt felületi diffúziót végez. Vagy ez a jelenség elhanyagolható?