

Válasz Dr. Bene László opponensi véleményére, amelyet “Sejt- és lipid membrán struktúrák. Az elektromos-, termális- és kémiai kölcsönhatások szerepe.” című MTA doktori értekezésemre adott.

New York, 2012. március 12.

Dr. Sugár István

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?

Válasz az 1. kérdésre

A tézisek 3.8 pontjában említettem a lipid-domének ágas-bogas topológiáját. Ezek az eredmények kétkomponensű foszfolipid membránokra vonatkoztak, ahol az egész membrán vagy fluid vagy gél állapotban van. Az elektropórusok keletkezésének a membrán fluid állapota kedvez (lásd a következő bekezdést). A membrán felületre merőleges elektrmos tér a membrán minden pontjában laterális erőket eredményez, amelyek a membránt összetartó erőkkel szemben dolgoznak és pórus keletkezéshez vezethetnek elegendően erős tér esetén (Lewis T.J. A model for bilayer membrane electroporation based on resultant electromechanical stress. IEEE Trans. Diel. Electr. Insul. 2003, 10:769-777). Kétkomponensű, fluid állapotú, foszfolipid membránok esetén a kompozíciós domének határán a membránt összetartó erők gyengébbek mint a domének belsejében (ez a megállapítás a kooperativitási paraméter,  $w_{12}'' = 80 \text{ cal/mol-lánc}$ , pozitivitásából következik (Sugár I.P. et al. Monte Carlo simulation of two-component bilayers: DMPC/DSPC mixtures. Biophys. J. 1999, 76:2099-2110)) és ezért az elektropórus keletkezés feltételezhetően nagyobb gyakorisággal történik a domén határokon. A fenti megállapítást alátámasztó kísérleteink azonban nincsenek.

Mielőtt válaszolnék a kérdés második felére szeretném megemlíteni, hogy Professzor Parkson Chong-gal együttműködésben régóta tanulmányozzuk foszfolipid/koleszterol keverékek tulajdonságait. Kísérleti eredményeink szerint a membrán tulajdonságok úgynevezett kritikus koleszterol koncentrációknál maximumot (vagy minimumot) mutatnak (Venegas B., Sugár I.P., Chong P.L.-G. Critical factors for detection of biphasic changes in membrane properties at specific sterol mole fractions for maximal superlattice formation. J. Phys. Chem. B. 2007, 111: 5180-5192). Ezeket a tulajdonságokat csak akkor lehetett kimérni ha a rendszerben a koleszterol keverési arányát nagyon kis lépésekben ( $\approx 0.3 \text{ mol\%}$ ) változtattuk. A kísérleteket értelmező elméleti model (Sugár I.P., Chong P.L.-G. A Statistical Mechanical Model of Cholesterol/Phospholipid Mixtures: Linking Condensed Complexes, Superlattices, and the Phase Diagram. J.Am.Chem.Soc. 2012, 134: 1164-1171) nagy jelentőséget

tulajdonít a koleszterol foszfolipidekre gyakorolt kondenzáló hatásának. Kimutatjuk, hogy a keverékben fluid és kondenzált fázisok egyszerre vannak jelen, és a kritikus koncentrációknál a kondenzált fázis részaránya maximumot ad.

Elektrooptikai forgatás és abszorpció relaxzációs mérések azt mutatják, hogy növekvő membrán koleszterol tartalom csökkenti a membrán elektroporációt (Kakorin S. et al. Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles. *Biophys. Chem.* 2005, 117:155-171). Ezt az eredményt a szerzők a koleszterolnak a foszfolipidekre gyakorolt kondenzáló hatásával hozzák kapcsolatba. Azonban Kakorin és munkatársai kísérleteikben a koleszterol keverési arányát nem változtatták elég kis lépésekben és ez elfedte a kritikus koncentrációknál tapasztalható szélsőérték tulajdonságokat. Úgy gondolom, hogy minden kritikus koncentrációnál a membrán elektroporációnak lokális minimuma van, mivel elektropórusok csak a fluid fázisban keletkeznek.

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 rácsméreteknel? Mitől függ a méretküszöb értéke mely felett az energiaeoszlás unimodális?

Válasz a 2. kérdésre

Ezeket a szimulációkat olyan hőmérsékletnél végeztem, ahol a rendszer fele olvadt állapotban van. Kis rácsméret esetén ez úgy valósul meg, hogy a rendszer az idő felében főleg gél, az idő másik felében főleg fluid állapotban van. A kritikus rácsméret fölött pedig minden időpontban a rendszer kb. fele gél és a másik fele fluid állapotban van. Kis rácsméret esetén tehát az energiaeoszlás kétcsúcsú: a kisebb energiához tartozó csúcs a főleg gél, a nagyobb energiához tartozó csúcs a főleg fluid állapotú rendszernek felel meg. Kis rácsméret esetén lényeges eltérés a homogén fázistól túl nagy szabadenergia növekedéssel járna: egyrészt jelentős lenne az energia növekedés, amely a gél-fluid fázishatárok fenntartásához kell, másrészt kicsi lenne az inhomogenitás miatti keverési entrópia növekedés. Az energianövekedés különösen nagy lenne mivel kis rendszerben csak kis gél/fluid domének keletkezhettek, azaz a domének szinte minden eleme a gél-fluid fázishatáron lenne. Nagy rendszerben, a nagy domének tartalmaznak sok energetikailag kedvezőbb belső pontot is. A rács méretküszöb tehát ott található, ahol már belső ponttal rendelkező domének megjelennek. Fontos megjegyezni, hogy minden szimuláció periódikus határfeltételek mellett történt, tehát rács-felületi hatásoknak nincs szerepe.

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?

Válasz a 3. kérdésre

A hosszútávú kölcsönhatások lipid struktúrára gyakorolt hatását kétkomponensű lipid membránokon tanulmányozták, ahol az egyik komponens fejcsoportja töltéssel rendelkezett (Shoemaker S.D., Vanderlick T.K. Intramembrane electrostatic interactions destabilize lipid vesicles. *Biophys. J.* 2002, 83:2007-2014). Növelve a töltéssel rendelkező komponens arányát a laterális rugalmassági állandó nem változott, de a membrán stabilitás lényegesen csökkent. Szobahőmérsékleten ezek a kétkomponensű rendszerek nem mutattak fázisszeeparációt (Findlay E.J., Barton P.G. Phase behavior of synthetic phospholipids and binary mixtures with phosphatidylcholines. *Biochemistry* 1978, 17:2400-2405; Graham I., Gagne J., Silvius J.R. Kinetics and thermodynamics of calcium-induced lateral phase separations in phosphatidic-acid containing bilayers. *Biochemistry* 1985, 24:7123-7131). Ezért arra következtetünk, hogy a töltött komponensek közti elektrosztatikus kölcsönhatás következtében e molekulák igyekeznek egymástól távol elhelyezkedni, azaz hexagonális rendet kialakítani. A hőmozgás következtében természetesen ez a rend sérülhet, amennyiben az ezzel járó energianövekedés összemérhető marad a termális energia egységével,  $kT$ -vel. Tehát nem várható, hogy a töltött lipid komponensek, nagy doméneket alkotva, különválnak a többi lipid komponenstől.

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 (tranziens) átrendeződését idézheti elő?

Válasz a 4. kérdésre

Az első kérdésre adott válaszomban említettem, hogy a fluid állapotú, kétkomponensű foszfolipid membrán kompozíciós domén szerkezete a  $w_{12}'' (= E_{12}'' - \frac{E_{11}'' + E_{22}''}{2})$

kooperativitási paraméter értékétől függ. Ugyanott szóba került, hogy a membrán felületére merőleges elektromos tér minden pontban igyekszik szétfeszíteni a membrán struktúrát. A sejtek nyugalmi potenciálja (-100mV) nem elegendő, hogy elektropórusok keletkezzenek, azonban kissé megnövelheti a láncok közötti átlagos távolságokat, és következésképp csökkentheti a láncok közti kölcsönhatási energiákat ( $E_{12}''$ ,  $E_{11}''$  and  $E_{22}''$ ). Ha a három kölcsönhatási energia megváltozása nem azonos értékű, akkor a nyugalmi potenciál befolyásolja a  $w_{12}''$  paraméter értékét és így a kompozíciós domének szerkezetét.

Úgy tűnik, hogy korai kísérleti eredményeink a fenti elképzeléseket alátámasztják. A BLM-eken (Black Lipid Membrane) mért nem-lineáris áram-feszültség karakterisztikák arra mutatnak (Sugár, I., Blaskó, K., Erdéi, L. (1978) Electric field induced defect-forming mechanisms in lipid bilayers. *Acta Biochim.Biophys.Acad.Sci.Hung.* 13, 193-

200; Sugár, I. (1979) Current-voltage characteristics of black lipid membranes and the related conformational changes. MTA Biol.Oszt.Közl. 22, 145-155), hogy a membránokban már 100mV membránpotenciál alatt is tér-indukálta strukturális változások történnek, amelyek növelik a membrán vezetőképességét. Elképzelhető, hogy e strukturális változások nagyobb valószínűséggel jelentkeznek a domének szélén, ahol a membrán struktúra a leggyengébb.

A 4. kérdés második felével kapcsolatban megemlítem, hogy az ioncsatornák közelében lévő lipid molekulák az erős fehérje-lipid kölcsönhatás miatt meglehetősen rigid állapotban vannak. Erre mutatnak mind a kalorimetriás mérések, mind pedig a molekuláris dinamikai szimulációk (Alonso A. et al. Protein-lipid interactions and differential scanning calorimetric studies of bacteriorhodopsin reconstituted lipid-water systems. Biochim. Biophys. Acta 1982, 689: 283-289; Tarek M. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. Biophys. J., 2005, 88:4045-4053). Ebben a rigid állapotban a lipid molekulák laterális diffúziója három nagyságrenddel lassúbb mint fluid állapotban (lásd az 1. Táblázatot a következő publikációban: Sugár, 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). Az ioncsatorna kinyílása megváltoztathatja a lokális membrán potenciált és a  $w_{12}^{gg}$  paraméter lokális értékét, amely a lipid-domén struktúra lokális (tranziens) átrendeződését idézheti elő. Azonban ez az átrendeződés nagyon lassú lesz a rigid lipid molekulák kis diffúziós állandója miatt.

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 sejtfelszíni antigének az és alegységek hetero-dimérjei, míg az MHCI antigének monomérek).

Válasz az 5. kérdésre

A kétkomponensű lipid dimér és monomér modellekre tett megállapításaink átvihetők hasonló rendszerekre. Ilyen rendszer lehet például egy egykomponensű lipid membránfelület, amelyet kétfajta periferiális fehérje, szorosan pakoltan, teljesen beborít. Szorosan pakolt rendszer létrejöhet, ha a két fehérje komponens keresztmetszete eléggé hasonló.

6. A FRAP mérésekből adódó küszöbhőmérsékletek inkább a gél állapotú lipid-domének perkolációs-küszöb hőmérsékleteivel korrelálnak semmint a folyékony doménekével. Ennek mi az oka?

Válasz a 6. kérdésre

A FRAP küszöbhőmérséklet megegyezik azzal a hőmérséklettel, ahol a gél domének perkolációs frekvenciája 0.36. Azaz, az idő 64 százalékában nagy, de nem perkolált, gél állapotú domének vannak jelen a membránban, míg az idő 36 százalékában egyetlen perkolált gél állapotú domén van jelen, sok kicsi gél domén mellett. A FRAP küszöbhőmérséklet alatt a fluoreszcens molekuláknak tehát meg kell kerülni ezt (vagy ezeket) az ágas-bogas, nagy gél domént (vagy doméneket), hogy az előzőleg megvilágított (photobleached) térrészbe jussanak. E hosszú, bonyolult út megtétele sok ideig tart. A FRAP küszöbhőmérséklet fölött viszont a gél domének kicsik, szerkezetük egyszerű és ezért a fluoreszcens molekulák könnyen megkerülhetik őket. Tehát annak ellenére, hogy a fluoreszcens molekula a nagy összefüggő (perkolált) fluid doménben diffundálhat, ahol a fluoreszcens molekulák diffúziós állandója három nagyságrenddel nagyobb mint a gél doménben (referencia a 4. kérdésre adott válaszban), a photobleached térrész elérése hosszú időt vehet igénybe mivel a diffúziós út nagyon hosszú a gél domén(ek) mérete és bonyolult szerkezete miatt.

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) észlelnék-e?

Válasz a 7. kérdésre

Annak érdekében, hogy a kérdésre válaszoljak konzultáltam Luis Bagatolli Professzorral, aki a lipid klaszterek struktúráját két évtizede vizsgálja. Elmondta, hogy kísérletileg még nem képesek a komponensek klaszteren belüli eloszlását megfigyelni. Polarizációs két-foton fluoreszcens mikroszkóp segítségével megfigyeltek azonban óriás gél klasztereken belüli szubklaszttereket (Bernchou U. *et al.* Texture of lipid bilayer domains. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131:14130-14131), ahol egy szubklaszteren belül a lipid molekulák orientációja (orientation of the tilt angle) hasonló.

Fehérje-membrán kölcsönhatás modellezése:

8. A sejtek nyugalmi membránpotenciáljának lehet-e hatása a lipáz fehérje membránhoz történő kihorgonyzásához, azaz a membránpotenciál befolyásolhatja-e a periferiás fehérjék közreműködésével történő jelátviteli folyamatokat?

Válasz a 8. kérdésre

Erre a kérdésre adott válaszom a 4. kérdésre adott válaszból következik. Mivel a nyugalmi membránpotenciál befolyásolhatja a sejt domén struktúráját, elképzelhető, hogy a hidrofób domének méretét, s így a kolipáz fehérje membránhoz történő adszorbeióját is befolyásolja.

9. Az apoláris régiókhoz való kitapadás mellett a lipáz (vagy PKC) fehérjék membránhoz történő „kihorgonyzására” alternatív mechanizmust is javasoltak: amikor a peiferiális fehérje egy kiálló magányos lipid-lánchoz („inverted non-lamellar L phase”) kötődik (Paavo K.J. Kinnunen, Chemistry and physics of lipids, 1996. 81. 151-166). Mennyire kell ezt a mechanizmust számításba venni?

Válasz a 9. kérdésre

A Kinnunen által javasolt mechanizmus olyan fehérjékre vonatkozik amelyek hidrofób üreggel rendelkeznek, ahova a membrán egy lipid molekulájának egyik hidrokarbon lánc bejut és a membrán felülethez horgonyozza a fehérjét. A mi általunk javasolt mechanizmus olyan fehérjékre vonatkozik, amelyek felületén ‘sima’ hidrofób felület található. Ez a fehérje felület odatapadhat a membránhoz, ha a membrán felületen kellő nagyságú hidrofób felület alakul ki.

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?

Válasz a 10. kérdésre

A hámsejtek pillanatnyi modellje nem lokalizálja a receptorok helyét. Feltételezi, hogy a receptorok a membrán felületén homogénen oszlanak el. Pontosabban, az egységnyi membránfelületen a ligand receptorok száma arányos a  $\kappa$  paraméterrel és bármelyik, membrán felülethez közeli, ligand  $\kappa$ -val arányos valószínűséggel megkötődhet. Ez a model érvényét veszti, amikor a receptorok felületi sűrűsége alacsony. Ebben az esetben a model módosításra szorúl a bíráló javaslatának megfelelően.