

B3597
u)

**HOSSZÚ SZÉNLÁNCÚ POLITELÍTETLEN
ZSÍRSAVAK DINAMIKÁJA A KÖZPONTI
IDEGRENDSZERBEN KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A
KÖRNYEZETI HATÁSOKRA**

A doktori (PhD) értekezés tézisei

Szepesné Kitajka Klára

témavezető:

Dr. Farkas Tibor D.Sc.
tudományos tanácsadó



MTA SZBK Biokémiai Intézet
Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány
Biotechnológiai Kutatóintézet

Szeged
1999

BEVEZETÉS

A poikiloterm szervezetek, melyek testhőmérséklete majdnem megegyezik az őket körülvevő közeg hőmérsékletével, igen gyakran vannak kitéve különböző környezeti hatásoknak. Legfontosabb perturbáló tényező életük folyamán a hőmérséklet. Ezen változások első célpontja a sejtek membránja.

A biológiai membránok számos létfontosságú biokémiai folyamat színterei. Meghatározzák az oldott anyagáramlás szabályzásával, s specifikus cserefolyamatok katalizálásával a celluláris és szubcelluláris kompartmentek jellegzetes kémiai összetételét. Irányítják az általuk határolt kompartmentek közötti információcserét ligand specifikus receptorok segítségével. Mátrixként szolgálnak többkomponensű metabolikus folyamatokat katalizáló enzimek számára, s nem utolsó sorban energiát raktározhatnak transzmembrán ion ill. oldottanyag gradiens formában és szabályozzák ezen energiák további felhasználását.

Ezen funkciók mediálásában fontos szerepet kapnak a membránlipidek, azon tulajdonságaikból kifolyólag, hogy alapvető membránalkotóként gátolják az oldott anyagok szabad diffúzióját, membránalkotók "oldószereként" működnek, membránfehérjék aktivátorai ill. konformációjuk stabilizálói. Így tehát a membránszerkezetekben bekövetkező különböző környezeti hatások által indukált perturbációk a membránfunkciók megváltozását vonják maguk után.

Jelenlegi membránmodellekben központi szerepet kap a lipidek dinamikus állapota. A lipidek igen sokoldalú molekulák a fizikai-kémiai paraméterek terén, sokszor különösen érzékenyek a környezet állapotának változásaira. A szervezetek eredményesen hasznosítják a különböző környezeti tényezőkhöz való adaptálódás során a membránlipidek sokoldalúságát. A lipidösszetevők átrendeződésével fenntartják a lipid kettősréteg dinamikus állapotát, biztosítva így a megfelelő membránfunkciókat. Következésképp a környezeti hatásoknak kitéve is képesek alkalmazkodni az uralkodó környezeti feltételekhez.

Tekintettel arra, hogy a központi idegrendszer lipidtartalmára és anyagcseréjére vonatkozó vizsgálatokat majdnem kizárólag emlősökön végezték, érdekesnek látszott a kérdést tágabb aspektusból is megvizsgálni, nevezetesen megnézni azt, hogy az

evolúció alacsonyabb szintjén álló szervezetek agyi zsírsav-, molekulaspeciesz összetétele ill. fluiditása hogyan változik a különböző környezeti hatásokhoz való adaptálódás során, s azt milyen princípiumok szabályozzák

CÉLKITŰZÉSEK

Tanulmányozni kívántuk a törzsfajlás különböző szintjein álló gerincesek központi idegrendszerének lipidösszetételét, lipidjeinek és membránjainak molekuláris architektúráját és azok biofizikai paramétereit abban a reményben, hogy olyan információkhoz jutunk, melyek közelebb visznek a lipidek szerepének megértéséhez, ebben a nagyon specializált szövetféleségben.

A vizsgálatokat két vonalon indítottuk el:

1. Megvizsgáltuk, hogy a táplálék zsírsavösszetétele milyen hatással van a neurális elemek zsírsavösszetételére.
2. Milyen hatással van a környezet/testhőmérséklet a membránok (szinaptikus plazmamembrán) ill. az agyból kinyert összes foszfolipid molekuláris összetételére és egyes biofizikai paramétereire. Ennek érdekében megpróbáltuk:

A/ kimutatni a membrán lipidkomponenseinek adaptációját, a hőmérséklet membránszerkezetre kifejtett hatását

B/ a membrán lipidösszetételében bekövetkező hőmérséklet indukálta változásokat azonosítani

C/ a hőmérséklet adaptáció hatékonyságát megfigyelni

D/ specifikálni azon molekulaspecieszeket, melyek létfontosságú szerepet játszanak a környezet hőmérsékletének változásához történő adaptálódás regulációjában

E/ megkísérelni megérteni a hőmérsékletadaptáció háttérében álló folyamatokat

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgált állatfajok:

Az 1. táblázat tartalmazza e tanulmány tárgyát képező fajok nevét, eredetét ill. testhőmérsékletét.

Minden esetben a helyszínen történt a vizsgálandó szervek kivétele a frissen megölt állatokból. A májakat és agyakat folyékony nitrogénbe helyezve juttaták el laboratóriumunkba.

A hőmérséklet-adaptációs vizsgálatok során az 1-1.5 kg-os pontyokat előzőleg 25°C-os ill. 5°C-os jól átlegegőztetett, cirkuláltatott vízzel töltött kádban tartottuk.

A hideghez szokott halak esetében a víz hőmérsékletét fokozatosan 5°C-ról 25°C-ra növeltük, a meleghez szokott halak esetében fordítva jártunk el, 25°C-ról 5°C-ra csökkentettük a víz hőmérsékletét.

További vizsgálatok során ezt folytatva újra lehűtöttük 5°C-ra ill. újra felmelegítettük 25 °C-ra a vízfürdő hőmérsékletét.

1. Táblázat

VIZSGÁLT FAJOK

FAJ	EREDET	TESTHŐMÉRSÉKLET
-----	--------	-----------------

Halak:

<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Magyarország	5°C
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Magyarország	5°C, 25°C
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Magyarország	5°C
<i>Cyprinus carpio</i>	Magyarország	5°C, 25°C
<i>Esox lucius</i>	Finnország	5°C
<i>Acerina cernua</i>	Finnország	5°C
<i>Coregonus alba</i>	Finnország	5°C
<i>Abramis brama</i>	Finnország	5°C
<i>Rutilus rutilus</i>	Finnország	5°C
<i>Clarias batrachus</i>	India	25°C
<i>Catla catla</i>	India	25°C
<i>Channa punctata</i>	India	25°C
<i>Hilsa ilisa</i>	India	25°C

Madarak:

<i>Branta canadensis</i>	Pasco, WA, USA	41°C
<i>Anas platyrhynchos</i>	Canada	41°C
<i>Gallus domesticus</i>	Magyarország	41°C

Emlősök:

<i>Bos taurus</i>	Magyarország	37°C
<i>Sus domesticus</i>	Magyarország	37°C
<i>Ovis aries</i>	Magyarország	37°C
<i>Rattus norvegicus</i>	Magyarország	37°C

Analitikai eljárások

Lipidek analízise

Lipidek kinyerése

A lipideket Folch és mtsai szerint nyertük ki (1957). Az extrahálás során kloroform/metanol 2:1 (v/v) arányú elegyét használtuk, majd a kapott totál lipid frakciót antioxidánsként BHT-t tartalmazó adott térfogatnyi benzolban vettük fel és -20° C-on tároltuk további feldolgozásig.

Vékonyrétegekromatográfia

A totál lipidekből a foszfatidiletanolamint (PE) és a foszfatidilkolint (PC) vékonyréteg kromatográfiával választottuk el G-60 szilikagél lapon (Merck). A futtató elegy kloroform/metanol/víz, 65: 15: 4 arányú keveréke volt. A foszfolipidek detektálására a következő módszert alkalmaztuk: 8-anilino-1-naftalin szulfonsav (ANS) 0,5%-os metanolos oldatával tettük UV fényben láthatóvá, majd kloroform/metanol (2:1) elegyével oldottuk le a szilikagélről. Bepárlást követően a PC-t és PE-t -20° C-on tároltuk további feldolgozásig BHT-t tartalmazó kloroformban

Gázkromatográfia

A foszfolipidek zsírsavösszetételét egy lángionizációs detektorral felszerelt Hitachi Model 260-80 gázkromatográfion határoztuk meg, miután metilészterré alakítottuk a lipideket 5 % HCl-t tartalmazó metanollal 80°C-on két és fél óráig. A zsírsavak egy 10 % FFAP (free fatty acid phase) borítású Supelcoport oszlopon váltak szét. A kvantitálást a gázkromatográfhoz kapcsolt Hitachi 260-80 integrátorral végeztük. Az azonosítás standart zsírsavak segítségével történt.

Molekulaspecieszek meghatározása

Az izolált PC és PE molekulaspeciesz összetételének meghatározására kezdetekben Takamura és mtsai (1986) leírása szerint került sor, melynek során a diacil-glicerolok dinitrobenzoil származékait analizáltuk egy UV-detektorral felszerelt Merck-Hitachi HPLC rendszeren. A továbbiakban lehetőségünk nyílt egy fluoreszcencia detektor beszerzésére, melynek segítségével körülbelül két nagyságrenddel kevesebb mennyiségből is meg lehet mérni a lipidek molekulaspeciesz összetételét (Bell, 1993).

Dinitro-benzoil származékok készítése

A körülbelüli 2 mg PC-t és PE-t bepároltuk és feloldottuk 1 ml dietil-éter és 1 ml 30 mM H_3BO_4 -t tartalmazó 10 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.5), majd 200 egység foszfolipáz C-t (*Bacillus cereus*-ből, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) adtunk hozzá és két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A keletkező diradil-glicerolokat dietil-éterrel extraháltuk, bepároltuk és 25 mg 3.5-dinitro-benzoil-kloridot adtunk hozzá 0.5 ml vízmentes piridin kíséretében, majd 60° C-on 10 percig inkubáltuk. A dinitro-benzoil származékokat n-hexánban oldottuk és mostuk 0.1 M HCl-, 0.1 M $NaHCO_3$ - és 1 M NaCl -oldattal. Az így nyert termékből a diacil-DNB származékokat fluoreszkáló TLC lapon (F254, G-60 Merck) tisztítottuk toluol/n-hexán/dietil-éter (50:45:4) futtató elegyben. A diacil foltokat lekapartuk, kloroform/metanol (3:1 v/v) elegyben oldottuk, majd szűrés, bepárlás után acetonitrilben tároltuk (-20°C-on) a HPLC analízis idejéig.

A molekulaspecieszeket folyadék-kromatográfiásan (HPLC) választottuk el Merck-Hitachi egy Nucleosil C-18 5 μ m, 4mm i.d. x 250 mm oszlopon acetonitril/propan-2-ol (80:20 v/v) eluenst használva, 1 ml/perc áramlási sebességgel. A detektálás 254 nm-en történt. A csúcsok azonosításához használatos standartokat (16:0/22:6, 18:0/22:6, 16:0/20:4, 18:0/20:4, 16:0/18:1, 16:0/16:0, 18:1/18:1, 18:0/18:1) a Sigma Chemicals-tól szereztük be és a relatív retenciók idői alapján Bell és mtsai (1991) szerint végeztük.

Antroil származék készítése

Ebben az esetben a foszfolipáz C-vel történő emésztés végtermékéig megegyezik a preparálás a fentiekben leírtakkal, annyi különbséggel, hogy jóval kevesebb, körülbelül 50 μg PC és PE elegendő.

A kapott diradil-glicerolokat 200 μl antroil-klorid acetónitriles oldatával inkubáltuk 60° C-on fél óráig. A reakciót 3 ml hideg 100 mM NH_4OH -oldat hozzáadásával állítottuk meg, majd többszöri mosás és tisztítás után HPTLC-n választottuk el a diacil-glicerol antroil származékait az előzőekben említett futtató elegyben.

A molekulaszékek szeparálását ez esetben egy Merck-Hitachi F-1050 fluoreszcens spektrofotométerrel felszerelt Merck-Hitachi HPLC rendszeren végeztük kétféle oszlopon. Az eluens vagy acetónitril/propan-2-ol (7:3 v/v) (Supelcosil LC-18), vagy metanol/ propan-2-ol (4:1 v/v) izokratikus elegye (C-8 oszlop) volt. Az oszlop és az áramlási sebesség megegyezett a fentiekben ismertetettel.

Fluoreszcencia anizotrópia mérése

A fluoreszcens jelölőket tartalmazó vezikulák elkészítése a következőképpen történt: A 250 μg -nak megfelelő foszfolipidet 500 μl benzolban vettük fel, majd hozzáadtunk 10 μl tetrahidrofuranban oldott 1 μM 2- és 12-(9-anthroyloxy) sztearinsavat (2- és 12-AS) ill. 16-(9-anthroyloxy) palmitinsavat (16-AP) (Molecular Probes Inc. OR, USA). Alapos vortexelés után az adott szolvenst bepároltuk és vezikulákat készítettünk. A méréseket és a steady-state anizotrópia kialakulását Dey és mtsai (1993) szerint végeztük.

A szinaptikus plazmamembránok fluiditás vizsgálatokor az adott membránokat 10 μl DPH-val (1,6-difenil-1,3,5-hexatrién) (Molecular Probes) jelöltük a mérés kezdete előtt 15 perccel. A fluoreszcencia anizotrópia méréseket 2° C és 30°C ill. 5°C és 45°C között végeztük 2°C-ként egy komputerizált, termosztált Hitachi MPF-2A spektrofotofluoriméterrel Dey és Farkas (1992) szerint, 360 nm gerjeszési ill. 430 nm emissziós hullámhosszon.

Szinaptikus plazmamembránok készítése

A szinaptikus plazmamembrán frakciót az alábbiak szerint készítettük el. 6-7 g-os agyakat homogenizáltunk teflon homogenizátort alkalmazva 0.32 M-os (pH 7.1) cukor oldatban (1 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 50 mM TRIS HCl). Az így kapott homogenizátumot 1000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót 13000 g-vel 30 percig ülepitettük, szuszpendáltuk cukor oldatban, majd centrifugáltuk egyszer 10800 g-n 20 percig, majd 14000 g-vel szintén 20 percig. Ezután a pelletet Dounce homogenizátorral szuszpendáltuk és 0°C-on 30 percig lizáltuk. Végül a membránokat egy 10%, 28.5% és 34%-os cukor gradiensre helyeztük és Beckman SW 27 rotor (Beckman Instruments, Fullerton, CA) használatával 60 percig centrifugáltuk. A szinaptikus membránokat a 28.5% és 34 %-os cukor oldatok interfészéből gyűjtöttük össze, majd -80°C-on tároltuk további felhasználásig.

EREDMÉNYEK

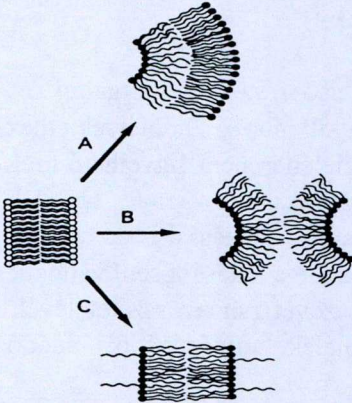
- I./1. Hideg- és meleg-adaptált pontyok agyi zsírsavösszetétele nem különbözött lényegesen.
- I./2. Evolúciósan két szélsőséges hőmérséklethez (boreális, szubtrópusi) alkalmazkodott halak esetében - melyek évmilliók óta élnek konstans hőmérsékleti viszonyok között, s nincsenek kitéve hőmérsékleti fluktuációknak – jól látható az agy totál lipid összetételének vizsgálata során, különösen a 22:6 ω -3 szintjében, az eltérő hőmérsékletekhez való alkalmazkodás.
- I./3. A különböző zsírsavösszetételű táplálék hatása nem tükröződik a halak agyi zsírsavösszetételében, ugyanakkor a máj ill. zsírszövet zsírsavösszetétele pontosan mutatja a táplálék minőségéből adódó különbségeket.
- II. A hőmérsékleti evolúció során az agy szinaptikus plazmamembrán 22:6 ω -3 tartalma csökken a test/környezet hőmérséklet növekedésével.
- III. Az agy diacilfoszfatidiletanolamin molekulaszpeciesz összetételét tekintve a 18:0/22:6 és 18:1/22:6 specieszek összege állandó, míg a diacilfoszfatidilkolin esetében összegük növekszik a test/környezet hőmérséklet emelkedésével.
- IV. Az eltérő táplálkozású halak agyi molekulaszpeciesz összetétele nem különbözik egymástól számottevően.
- V. A 18:1/22:6 PE mennyisége a kísérletes körülmények között változtatott hőmérséklet ingadozásait téli halakban részben, nyári halakban folyamatosan fordított arányban követte.

- VI. Összehasonlítva a 22:6 ω -3 tartalmú molekulaspecieszek (18:0/22:6; 18:1/22:6) szintjét ponty májban, szérumban és agyban, azt tapasztaltuk, hogy a fenti specieszek az agyi diacilfoszfatidiletanolaminban többszörös mennyiségben fordulnak elő.
- VII./1. A hideg-adaptált halak agyából készített foszfolipid vezikulák fluidabbak a meleg-adaptáltakhoz képest, mind antroiloxizsírsvakkal (2- és 12-AS, 16-AP), mind DPH próbával való jelölés során.
- VII./2. A fluiditások párhuzamosan változtak mindkét esetben a kísérletes körülmények között változtatott hőmérséklet ingadozásával.
- VIII. A hőmérsékleti evolúció folyamán az 1-monoén 2-polién agyi molekulaspecieszek mennyisége csökkenő tendenciát mutat a test/környezet hőmérséklet növekedésével.
- IX. Az agyi foszfatidiletanolamin tartalom döntő többségét az alkenilacil-foszfatidiletanolaminok (etanolamin-plazmalogének) képviselik.
- X./1. Az etanolamin-plazmalogének szintje meleg-adaptáció során kevésbé, hidegstressz hatására fordított arányban követi a környezet hőmérsékletében bekövetkező változást.
- X./2. Evolúciós viszonyokat tekintve az etanolamin-plazmalogének molekulaspeciesz összetétele igen állandó.
- XI. A 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin speciesz agyba való beépülésének mechanizmusára egy hipotézist mutatunk be (1. ábra), melynek lényege az, hogy ez a speciesz a lipoproteinekből kerül az agyba. A lipoproteinek ugyanis gazdagabbak mind 18:1/22:6 PE-ben, mind pedig etanolamin-plazmalogénekben, következésképp igen fuzogének. Így ezek az agyi mikrokapillárisokkal fuzionálva végülis megjelennek a neuronokban.

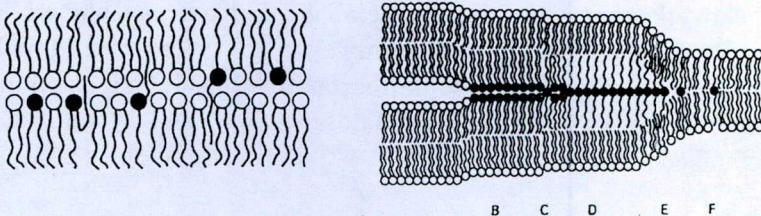
A MEMBRÁNFÚZIÓ ELKÉPZELT MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSA

(Kinnunen, 1992)

A kónikus alakú molekulák jelenléte egy ún. negatív görbületi feszülést hoz létre, melynek a cilindrikus foszfolipidek ellenállnak. A fenti ábra a bilayer membránok lehetséges alakváltozásait mutatja kónikus foszfolipidek jelenlétében. Nem lehetséges sem az egyik monolayer görbületének növekedésével a



másik csökkenése (A), sem a két réteg görbületének egyidejű növekedése (B) a bilayer konfiguráció kialakulása során. Így csak a planáris változat (C) a megfelelő, amikor is ebből a stresszelt állapotból úgy szabadul meg a rendszer, hogy a kónikus foszfolipidek egyik zsírsavláncukat a vizes fázisba nyújtják (frusztrált állapot), mellyel kompenzálják a membrán görbülését. Az ilyen frusztrált állapotú membrán érintkezése egy nem frusztrált állapotú membránnal elősegítheti egyrészt a foszfolipidek kicserélődését a két membrán között (pl. 18:1/22:6 PE speciesz átcsúszik az érintkező membránba) (bal oldali ábra), másrészt a két réteg fúzióját (jobb oldali ábra).



1. Ábra

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A disszertáció témáját azon munkák alkotják, melyek során arra kerestünk választ, hogy a gerincesek, főképpen a halak központi idegrendszere lipidösszetételének, membránjai molekuláris architektúrájának ill. biofizikai paramétereinek megváltozása különböző környezeti hatásokhoz (diéta, hőstressz) való alkalmazkodáskor, milyen relációban áll ezen szerkezeteket alkotó lipidek összetételének megváltozásával.

A részletezett vizsgálataink első részében vizsgáltuk és megállapítottuk egyrészt, hogy a különböző hőmérséklethez adaptálódott halak agyi zsírsavösszetételében nem figyelhető meg számottevő különbség, másrészt, hogy a táplálék zsírsavösszetétele nincs befolyásoló hatással az agy zsírsavösszetételére, mely igen stabil, s diéta hatására sem változik összetétele. Ellentétben a máj ill. zsírszövet zsírsavösszetételével, melyek pontosan tükrözik a táplálék minőségéből adódó különbségeket.

A dolgozat következő részében igyekeztünk rávilágítani az eltérő hőmérsékletre adaptálódott szervezetekből izolált individuális membránok (szinaptikus plazmamembrán) ill. ezeket alkotó foszfolipidekből készült vezikulák fluiditása és molekulaspeciesz összetétele közti kapcsolatra. Megállapítottuk, hogy evolúciós vonatkozásban a gerinces fajok agyi szinaptikus plazmamembránjaiban a dokozahexaénsav tartalom a test/környezet hőmérsékletével párhuzamosan csökken. Különböző hőmérsékletre adaptált pontyok esetében kiderült, hogy a 18:0/22:6 és 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin molekulaspeciesz mennyisége eltérően reagál a hőmérsékletben bekövetkezett változásokra, előbbi csökken a hőmérséklet csökkenésével, utóbbi pedig növekszik, de összegük minden esetben állandó. Ellentétben a foszfatidilkolinnal, ahol az említett két speciesz összege folyamatosan növekszik a hőmérséklet emelkedésével.

Fluiditás vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a hideg- és meleg-adaptált halak agyi foszfolipid molekulaspeciesz összetételében észlelt változások valóban realizálódnak, s fluiditásbeli különbségeket eredményeznek, mind antrioiloxi mind DPH próbákkal való jelölés során kísérletes körülmények között is.

Megfigyeléseinkből kiderült, hogy bizonyos 1-monoén 2-polién PE molekulaspecieszek, az evolúciós skálát tekintve összefüggést mutatnak a test/környezet hőmérséklettel ill. az etanolamin-plazmalogének aránya, noha konstans a gerinces törzsfajlás folyamán, hidegstressz hatására megnő. Így együtt az éterlipidek és az 1-monoén 2-polién foszfatidiletanolamin molekulaspecieszek jelentős szerepet kapnak a hőmérséklet változáshoz történő adaptálódás regulációjában.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Fodor, E., Jones, H. R., Buda, Cs., **Kitajka, K.**, Dey, I., Farkas, T.,: Molecular architecture and biophysical properties of phospholipids during thermal adaptation in fish: an experimental and model study.- *Lipids* 30, 1119-1126 (1995).

Kitajka, K., Buda, Cs., Fodor, E., Halver, J. E., Farkas, T.,: Involvement of phospholipid molecular species in controlling structural order of vertebrate brain synaptic membranes during thermal evolution.- *Lipids* 31, 1045-1049 (1996).

Roy, R., Fodor, E., **Kitajka, K.**, Farkas, T.,: Fatty acid composition of the ingested food only slightly affects physicochemical properties of liver total phospholipids and plasma membranes in cold adapted fresh water fish- *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 1-11 (1999).

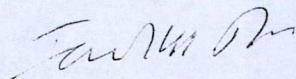
NYILATKOZAT

Kijelentjük, hogy Szepesné Kitajka Klára

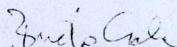
- a *"Molecular architecture and biophysical properties of phospholipids during thermal adaptation in fish: an experimental and model study. Lipids, 30, 1119-1126 (1995),"*
- az *"Involvement of phospholipid molecular species in controlling structural order of vertebrate brain synaptic membranes during thermal evolution. Lipids 31, 1045-1049 (1996)"*
- és a *"Fatty acid composition of the ingested food only slightly affects physicochemical properties of liver total phospholipids and plasma membranes in cold adapted fresh water fish. Fish Physiology and Biochemistry 20, 1-11 (1999),"*

címmel megjelent közleményekben végzett munkája meghatározó jelentőségű, s ezen közleményeket mindeddig nem használtam fel tudományos fokozat (Ph.D.) szerzéshez, mint ahogyan azt a jövőben sem fogom tenni.

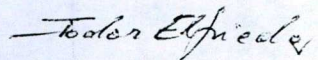
Szeged, 1999. 02. 10.



Dr. Farkas Tibor



Dr. Buda Csaba



Fodor Elfrieda