

**FOSZFOLIPIDEK SZEREPE HŐMÉRSÉKLET-
ADAPTÁCIÓBAN**

DOKTORI (PhD) DISSZERTÁCIÓ TÉZISEI

BUDA CSABA

MTA, SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT

BIOKÉMIAI INTÉZET

SZEGED

1996.

A membránokban számos létfontosságú folyamat zajlik. A sejt membránjai: (1) szabályozzák az oldott anyagok szabad diffúzióját és specifikus cserefolyamatokat katalizálnak, melyek együtt határozzák meg a celluláris és szubcelluláris kompartmentek egyedi kémiai összetételét; (2) transzmembrán ion és oldottanyag gradiens formájában energiát raktároznak, s regulálják ezen energiák felhasználását; (3) mátrixként szolgálnak a többkomponensű metabolikus folyamatokat végző enzimeknek; és (4) az általuk elhatárolt kompartmentek közötti információcserét irányítják ligandum specifikus receptorok segítségével. A membránlipidek központi szerepet játszanak ezen funkciók mediálásában, azzal, hogy: (i) az elektrolitok szabad diffúzióját gátolják, (ii) a membránt felépítő alkotók szolvensei, és (iii) a membránfehérjék megkötői, aktivátorai és konformációs stabilizálói.

A membránszerkezetek jelenleg használatos modelljeiben központi szerepet kap a lipidek dinamikus állapota. Mégis a lipidek, melyek alapvető struktúrális elemei a membránoknak, polimorfikusak, és komplex fázisviselkedést mutatnak, melyek gyakran különösen érzékenyek a fizikai környezet állapotának változásaira (hőmérséklet, nyomás, pH, víz aktivitás, stb.). Valójában egyetlen más biológiai molekula sem mutat nagyobb sokoldalúságot a fizikai és kémiai paraméterek széles tartományában. Következésképpen a membránszerkezetben bekövetkező, a környezet által indukált perturbációk, a fiziológias funkciók megváltozását eredményezik.

Azok a szervezetek, melyek különböző környezetben élnek, vagy melyek szélsőséges körülményekhez adaptálódtak, sikeresen hasznosítják (megfelelő metabolikus lépésekkel) a membránlipidek kémiai sokoldalúságát úgy, hogy a megfelelő fizikai tulajdonságokkal bíró lipidek alkalmazkodnak az uralkodó környezeti feltételekhez. A membránlipid összetevők aktív átrendeződés eredményeként, a fellépő változásra válaszolva, megőrzik a kettősréteg megfelelő dinamikus állapotát, s a környezeti hatást követően visszaállítják a membránfunkciókat.

A poikilothermek, melyek testhőmérséklete nagyjából megegyezik az őket körülvevő közeg hőmérsékletével, gyakran vannak kitéve a környezet hatásainak. A legfontosabb perturbáló tényező életük során a hőmérséklet. Sejtjeikben a membránok az első célpontjai az ilyen irányú változásoknak. Általánosan elfogadott az a tény, hogy a membrán lipid komponensei a felelősek a membrán fizikai és kémiai állapotának ezekhez a körül-

ményekhez történő hozzáigazításáért. A hőmérséklet hatására bekövetkező változások várhatóan gyorsak, reverzibilisek, és nem függenek az élőlény hőmérsékleti előéletétől. Ezek az organizmusok a lipidek szerkezeti sokféleségét használják ki a membránok formálásához, oly módon, hogy fluidabbá válnak alacsony hőmérsékleten, és rigidebbé magasabb hőmérsékleten. Az efajta szabályozás első kimutatása Farkas és mtsai. (1961, 1964) nevéhez fűződik, akik úgy találták, hogy bizonyos édesvízi rákokból nyert lipidek olvadáspontja mindig egy pár fokkal a víz ill. testhőmérséklet alatt volt. Másszóval ezen élőlények lipidjei éppen olvadt állapotban voltak. Mintegy 15 évvel később Sinensky (1974) észrevette, hogy az *Esherichia coli*-ból izolált foszfolipidek termotróp fázistranzíciója mindig jóval a növekedési hőmérséklet alatt volt. A jelenséget homeoviszkozus adaptációnak nevezte.

Jelenlegi tudásunk szerint több módja van annak, hogy a poikilotermekek membránjaik fizikai állapotát a hőmérséklethez igazítsák. Egyfelől növelhetik vagy csökkenthetik a már meglévő zsírsavláncok telítetlenségi fokát, ezzel változtatva a telített / telítetlen zsírsavak arányát. Ismeretes, hogy egy új kettőskötés bevitelle az acilláncba az olvadáspont csökkenését eredményezi, s részben ugyanez igaz a foszfolipidek termotróp fázistranzíciójára is. Másik lehetőség a fejcsoportok átrendeződése; főleg a foszfátidil-kolin (PC) és a foszfátidil-etanolamin (PE) változása mutatható ki. A hideghez alkalmazkodó poikilotermekekben többnyire a PE halmozódik fel, s a PC mennyisége általában csökken. Következésképp a PC / PE arány pozitív korellációban áll a hőmérséklettel.

Az egyes foszfolipidekben a glicerolvázhoz két zsírsav kapcsolódik, s a biológiai membránokban található nagyszámú (n) zsírsav segítségével rengeteg (elvileg n^2) számú ún. molekulaspeciesz jöhet létre. Ha a membránlipid acillánc és poláros fejcsoport összetétele szignifikánsan változik, a foszfolipid molekulaspecieszek eloszlásának is változnia kell. Az állítás azonban fordítva nem igaz, ugyanis a molekulaspecieszekben történő szignifikáns változás megtörténhet anélkül is, hogy az acilláncok vagy a fejcsoportok összetétele változna. Így lehetséges a zsírsavak "újrakeverése", ami új molekulaspecieszek keletkezéséhez vezet, anélkül, hogy a membrán zsírsavösszetétele megváltozna. Gyakran csak néhány molekulaspeciesz arányának változása felelős az aklimatizációs válaszlépések nagy részéért, azt sugallva, hogy a molekulaspecieszek hőmérséklet-adaptációjában a diszaturált és az egyszerűen telítetlen foszfolipid specieszek közötti egyensúlynak fontos szerepe lehet. Mivel a specieszek újrendezéséhez nincs szükség új molekulák bioszintézisére, a

mechanizmus nem igényel metabolikus befektetést, és ezért különösen fontos lehet alacsony hőmérsékleten, ahol a foszfolipidek szintézise leáll, s a már meglévő lipidek manipulációja az egyetlen módja a funkciók visszaállításának. A molekulaspecieszek megváltozása miatt a membrán fizikai tulajdonságai is megváltoznak, így befolyásolva a lipid membrán-funkcióit a hőmérsékleti válaszokban.

Az előbbiekben említett kémiai változások mindegyike a membrán fluiditásának megváltozásával jár, ami közvetlen bepillantást enged a membránt alkotó molekulák fizikai rendezettségének nyomon követésére. Így bármely változás a lipidösszetételben várhatóan a fluiditás megváltozásaként tükröződik, másszóval a membrán fluiditásában bekövetkező változások a membránlipidek összetételének megváltozását jelzik. Egyre több a bizonyíték arra vonatkozólag, hogy a hőmérséklet-adaptáció vagy diétás manipulációk eredményeként a zsírsavak telítetlenségében bekövetkező változás közvetlen kapcsolatban áll a membrán fluiditásának változásával.

A disszertáció első részében alacsony (5°C) és magasabb (25°C) hőmérséklethez szokott halak májából és rákokból preparált membránok, és azok foszfolipidjeinek vizsgálatával összefüggéseket keresünk a lipidmembrán fluiditása és a telített / telítetlen zsírsavak aránya közt. Emellett kísérletet teszünk a membránfluiditás és a foszfolipid molekulaspecieszek újrendeződése közti kapcsolat tisztázására.

A vizsgált rákok (*Pandalus borealis* és *Parapandalus sp.*) és a halak (*Ophiodon elongatus* és *Nemipterus hexodon*) totál foszfolipid (TPL), foszfatidil-kolin (PC) és foszfatidil-etanolamin (PE) frakciónak legfőbb zsírsav komponensi mindegyik fajban a 16:0, 18:0, 18:1, 20:4, 20:5 és 20:6, függetlenül földrajzi elhelyezkedésüktől és élőhelyük hőmérsékletétől. A telített / telítetlen zsírsavak aránya egyik esetben sem mutatott számottevő különbséget. Ennek ellenére, úgy találtuk, hogy a foszfolipid vezikulákba ágyazott különböző antroiloxi-zsírsavak (2-AS, 12-AS és 16-AP) fluoreszcencia anizotrópiája azt jelzi, hogy a hideghez szokott fajokból nyert membránok fluidabbak, mint a meleghez szokottakból preparáltak. Ez a fluidizáció legnyilvánvalóbb a bilayer felső, vagyis a 2-AS régiójában. Úgy találtuk hogy a hideg-adaptációt a 18:1 és a 20:5 zsírsavak mennyiségének növekedés kíséri, míg a 18:0 és 20:4 zsírsavak a melegebb helyen élő fajokban halmozódnak fel, különösen a PE-ben. A 20:5 hidegben való akumulálódásának talán táplálkozási eredete van, míg a 18:1 felhalmozódása szterikus okokra vezethető vissza. A dokozahexaénsav mennyisége egyik esetben sem tért el jelentős mértékben.

Csoportunk korábbi, halak máján elvégzett kísérleteiből kiderül, hogy hideg-adaptációban a PE *sn-1* pozíciójában több 18:1 található. Azonban a politelítettlen zsírsavak mennyiségének növekedése nem feltétlen szükséges a membrán fizikai állapotának hatékony kontrolljához. Egyes fajok például egyáltalán nem növelik PUFA tartalmukat: az evolúciósan különböző hőmérséklethez szokott tengeri és édesvízi halakban ezen zsírsavak mennyisége közel azonos. Azt is kimutatták, hogy halak képesek változtatni eritrocita membránjaik fluiditását anélkül, hogy zsírsavösszetételük, vagy a telített / telítettlen zsírsavak aránya változna. Ezek a megfigyelések azt jelzik, hogy a membránok hőmérséklet-adaptációjában sem a telített/telítettlen zsírsavak aránya, sem a PUFA szint emelkedése nem létfontosságú.

A patkányokkal végzett kísérleteink eredményei is azt jelzik, hogy a PUFA-k összmennyisége kevésbé fontos faktor. A napraforgó- és a halolajjal etetett patkányok májának zsírsavösszetételéből jól látható, hogy a halolajjal kapott állatokban kb. háromszor annyi ún. ω -3 politelítettlen zsírsav volt, s drasztikusan emelkedett a 20:5 és 22:6 mennyisége mind a totál foszfolipidben, mind a PE-ben. Úgy vártuk, hogy ezen patkányokból preparált foszfolipid vezikulák a 20:5 és 22:6 zsírsavak felhalmozódása miatt fluidabbak lesznek a másik csoporthoz képest. Meg kell azonban jegyezni, hogy a 18:1 mennyisége nem mutatott eltérést a két esetben. A PUFA összetételben és az SFA/UFA arányban jelentkező különbségek ellenére, ezek a foszfolipidek nem mutattak eltérést fluiditásukban. Ez azt jelzi, hogy a PUFA összmennyiségében történő változás nem játszik meghatározó szerepet a membrán rendezettségének szabályozásában.

Korábbi tapasztalataink szerint a molekulaspecieszek összetételének jelentős szerepe lehet a membrán hőmérsékletadaptációjában. A rákobból és a halakból nyert PC és PE molekulaspecieszek vizsgálatából az derült ki, hogy a hideghez szokott szervezetek esetén a 18:1/22:6 és 18:1/20:5 mennyisége 2-, 3-szorosára nőtt a PE-ben, de a PC-ben is jelentős ezen molekulaspecieszek felhalmozódása. Másfelől a meleghez szokott élőlényekben a 18:0/22:6 és a 18:0/20:5 mennyisége nőtt mindkét fajta foszfolipidben. Ezek az eredmények megegyeznek az általunk korábban észleltekkkel, a hideghez és meleghez szokott tengeri és édesvízi halakat illetően. A patkány máj PC, PE molekulaspeciesz összetételét megvizsgálva úgy találtuk, hogy a különbség a halolajjal és a napraforgóolajjal etetett patkányok között paralel a hideghez és a meleghez szokott halak közti különbséggel. A halolajjal kapott állatok májának PC-je és PE-je jóval több 18:1/22:6 és 18:1/20:5 specieszt

tartalmazott. A fenti eredményekből az következik, hogy a molekulaspeciesz összetétel kulcsfontosságú a hőmérsékletadaptációban.

Kérdés azonban, hogy a PC vagy a PE összetétele az ami inkább meghatározó jelentőségű. Korábbi eredményeinkből úgy gondoltuk, hogy a PE (18:1/22:6 és 18:1/20:5) molekulaspecieszek fontosabbak, mint a PC. Figyelembe véve a tényt, hogy a PE molekulaspeciesz összetétele létfontosságú a membrán regulációban, az összes izolált PC-ből vezikulákat preparáltunk, és összehasonlítottuk 2-AS, 12-AS és 16-AP segítségével mért fluiditásaikat. Nem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget egyik esetben sem. A következő lépésben ezeket a PC-ket kevertük az ellenkező faj PE-jével, vagyis a patkány PC-t az 1-monoén, 2-polién specieszben gazdag hal PE-vel és a hal PC-t az ilyen specieszeket alig tartalmazó patkány PE-vel. Úgy találtuk, hogy a hal PE-vel kevert patkány PC vezikulák fluidabb szerkezetet mutatnak a bilayer C_2 régiójában, míg a patkány PE-nek csak enyhébb hatása volt a hal PC fluidítására. A foszfolipid membrán mélyebb régiókban nem tudtunk különbségeket kimutatni.

Feltételezzük, hogy az 1-monoén, 2-polién molekulaspecieszek hatása, speciális molekuláris struktúrájukkal magyarázható. Számítógépes modellkísérletek szerint a PUFA-k egy kinyújtott ún. szögvas konfigurációt vesznek fel foszfolipidekben, ahelyett hogy hajtű alakúak, vagy helikálisak lennének. Ez megmagyarázza a napraforgó- és halolajjal etetett patkányok májából nyert foszfolipid vezikulák anizotrópia értékeiben jelentkező hasonlóságot, annak ellenére, hogy molekulaspeciesz összetételükben különbségek figyelhetők meg. Egy *cis* kettőskötés beépítése az *sn*-1 pozícióba ilyen foszfolipideknél, pl. a PE esetén, növeli a molekula felszínét. Valószínű ez a növekedés detektálható a 2-AS segítségével. Így tehát a hőmérséklet befolyásolja a molekula-struktúra modulációját, különösen a lipid bilayer felső részében. Azt azonban nem tudjuk, hogy a membrán alsóbb régió miért nem mutatnak változást. Egy estleges magyarázat, hogy a 12. szénatom alatti szegmens már elég fluid ahhoz, hogy a faj alkalmazkodni tudjon az új hőmérséklethez. A előzőekben leírt megfigyelésekből levonható az a következtetés, hogy a telített / telítetlen zsírsavak aránya alig játszik szerepet a membránok adaptációjában. A molekulaspecieszek, főleg a PE, újrendezése viszont fontos faktor a hőmérséklethez való alkalmazkodásban. Továbbá a lipid molekulákban bekövetkező változások nem magyarázzák az intakt membránok hőmérsékletadaptációját.

A tanulmány második részében alacsony (5°C) és magasabb (25°C) hőmérsékletre szokott pontyokból agysejt membránokat izoláltunk, s ezek, ill. az ezekből nyert foszfolipidek hőmérséklet-adaptációját vizsgáltuk. A ponty agy totál foszfolipidek nagy mennyiségben tartalmaznak dokozahexaénsavat (DHA). Ez a zsírsav a foszfatidiletanolaminban halmozódik fel inkább, mint a foszfatidilkolinban, de a különbség a hideghez és a meleghez szokott állatokban nem szignifikáns. A telített / telítetlen zsírsavak aránya változott a hőmérséklettel, alacsonyabb a hideg-adaptált halakban volt.

A pontyok PC és PE molekulaspeciesz összetételében jellegzetes különbségek voltak az aklimációs hőmérséklettel összhangban. Hasonló különbségek észlelhetők az evolúciósan különböző hőmérsékletre adaptálódott halak esetén is. A 18:0/22:6, 18:0/20:4 és a 16:0/18:1 speciesz dominált a PC-ben, s ehhez járult még a 16:0/22:6 a PE-ben, ahol azonban a 16:0/18:1 csak kis mennyiségben volt jelen. A 18:0/22:6 nagyobb koncentrációban volt jelen a meleghez szokott halakban, mint az alacsony hőmérsékletre szokottakban. Karakterisztikus különbségek jelentkeztek a 18:1/22:6 speciesz mennyiségében, ami jelentősen magasabb volt a PE-ben, mint a PC-ben a hideg- és meleg-adaptált állatokban is. Továbbá a 18:1/20:4 és a 18:1/18:1 molekulaspecieszek szintje 2-3-szor magasabb volt a hideghez szokott halakban, mint a meleg-adaptáltakban. A hideg-adaptált pontyok agyából készített foszfolipid vezikulákba ágyazódott 14-PGSL rotációs korellációs ideje kisebb volt, mint a meleg-adaptáltak esetén, azt jelezve, hogy az előbbi esetben a spinpróba környezete kevésbé rendezett, s a homeoviszkozus adaptáció 10%-os volt. Amikor a hideghez és a meleghez szokott halakat az ellenkező hőmérsékletre juttattuk (0.5°C / perc), sem az izolált foszfolipideknek a zsírsavösszetétele, sem az effektív rotációs korellációs idő nem adaptálódott az új hőmérsékletre. Ezzel szemben a hideghez szokott, de felmelegített halakból nyert vezikulák kevésbé rendezettekké váltak az alacsonyabb hőmérséklet-tartományban és fordítva.

Egy külön kísérletben az izolált agysejteket jelöltük a spinpróbával, hogy az intakt membránok által adott választ tanulmányozzuk. A sejtek hősokkját elkerülendő, a preparálás és a jelzés is az aklimációs hőmérsékleten történt, továbbá, az ESR mérések a melegítő ciklusban folytak a hideg-adaptált sejtek esetén, és a hűtő ciklusban a meleghez szokottaknál. Ez a megközelítés, szemben a foszfolipideknél tapasztaltakkal, a membrán struktúrális rendezettségének kb. 80%-os hőmérséklet- kompenzációját jelezte. Nem volt szignifikáns különbség a meleghez szokott és a hideghez adaptálódott felfűtött sejtekben

az effektív rotációs korrelációs időkben, és fordítva.

A kísérlet azt sugallta, hogy az agysejt membránok fizikai állapotának az új hőmérséklethez történő beállítása gyors és reverzibilis. Ezt megerősítendő, meleg-adaptált halakból preparált agysejteket hűtöttünk *in vitro* 10°C-ra, és a plazmamembránba ágyazott DPH-PA fluoreszcencia anizotrópiájának időfüggését figyeltük, a sejtek alikvotjának az inkubációs médiumból való kivétele után. Az anizotrópia paraméter csökkenni kezdett röviddel azután, hogy a sejtek az alacsonyabb hőmérsékletre kerültek, és 15-20 perc után egy állandó, alacsony értékre állt be. Mikor ugyanazt a sejtpopulációt újra felmelegítettük, az anizotrópia növekedett és néhány perc után elérte a kezdeti, magasabb szintet. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a meleghez vagy hideghez szokott halak agysejtjeit a spektrofotofluoriméter küvetájában hűtöttük vagy fűtöttük. Egy tipikus kísérletben, melyben hideg-adaptált halak sejteit tettük a műszer 25°C-os küvetájába, a fluoreszcencia anizotrópia növekedni kezdett néhány percen belül. Az intakt agysejt membránok fizikai tulajdonságainak az új hőmérséklethez történő aktív adaptációjának megnyilvánulásaként interpretáljuk ezeket az eredményeket. Enélkül az adaptáció nélkül ellenkező eredményeket kaptunk volna, vagyis az anizotrópia csökkent volna a felfűtött sejtekben, és fordítva.

A hőmérséklet csökkenésével lassuló metabolizmus ellenére, a hőmérsékletadaptált ponty agy PE molekulaspecieszeinek turnover figyelhető meg. A változásokat az 1-monoén, 2-polién és a dioleoil specieszek akkumulációja jellemzi, a környezet hőmérsékletének csökkenésével. Ésszerűnek látszik, hogy ezek a változások a hőmérséklet közvetlen hatásai a ponty agy lipid metabolizmusára, s nincsenek kapcsolatban a táplálkozással, hiszen ezek az állatok 10°C alatt nem táplálkoznak. Korábbi tanulmányok a hideghez szokott, ill. alacsony hőmérsékletnek kitett pontyok agyában a PUFA-k keletkezésének és szintjének növekedését mutatják be, s feltételezhető, hogy ezen zsírsavak egy hányada az aklimáció vagy a hőmérséklet csökkenés során transzportálódik az agyba. Kimutatták, hogy halak agysejtjei szelektíven vesznek fel és építenek be telítetlen zsírsavakat az inkubációs médiumból *in vitro*. Az alacsony hőmérséklethez szokott ponty agysejtjeiben a 18:1/22:6 PE szintje hasonlít ahhoz, amit a Finnországból beszerzett boreális halban találtunk, mint ahogy a hideghez (5-7°C) adaptálódott tőkehalnál és szivárványos pisztrángnál is látható. További vizsgálódásokat igényel annak eldöntése, hogy ezen speciesz akkumulálódása hideg hatására egy szelektív deaciláció / reacilációs reakció, a meglévő 18:0/22:6 specieszek deszaturációjának, vagy a májból történő szállításának

eredménye. Egy más összefüggésben kiderült, hogy ponty májsejtek előszeretettel észterestennek olajsavat az *sn-1* pozícióban *in vitro* körülmények közt hidegben, és az is, hogy ezen speciesz magas szintje jellemzi az evolúció során alacsony hőmérséklethez szokott tengeri és édesvízi halak májának PE frakcióját.

Az agy foszfatidil-etanolaminjainak acillánc összetételében bekövetkező változásokkal párhuzamosan, a hőmérsékletváltozást követő membránfluiditás adaptációjának magas szintje (70-80%) figyelhető meg, mint azt a spínjelölő és a fluoreszcencia polarizációs technikákkal kimértük. Bár a tanulmány során az egyedi membránokat nem szeparáltuk, patkány aggyal és *Channa punctatus*-szal végzett kísérletek eredményeit figyelembe véve, feltételezhető, hogy a ponty agy totál foszfolipidek zsírsavösszetétele hasonló a plazmamembránéhoz. Így feltételezhető, hogy mindkét jelölő (14-PGSL és DPH-PA) ezen struktúrák rendezettségét jelzik. Azonban még mindig kérdéses, hogy a PE acilláncaiban megfigyelt változások közvetlen kapcsolatban állnak a membrán fizikai állapotában megfigyelt nagyfokú hőmérséklet-kompenzációval. A domináló PC specieszek (16:0/18:1, 16:0/22:6 és 18:0/22:6) egyes fizikai tulajdonságai meglehetősen közel állnak egymáshoz, és ugyanez lehet igaz a PE-re is. Valóban, a kompenzáció csak kb. 10%-os volt, amikor a totál foszfolipideket vizsgáltuk.

A disszertáció harmadik részében arra kerestük a választ, hogy a különböző testhőmérsékletű gerincesek (hideg-adaptált hal, meleg-adaptált hal, emlős és madár) agyából preparált szinaptikus plazmamembránok rendezettsége és molekulaspeciesz összetétele között milyen összefüggések vannak.

A szinaptikus membránok PC és PE molekulaspecieszeinek összetételét vizsgálva úgy találtuk, hogy a hideg-adaptált hal PC-jében a 16:0/18:1 speciesz dominált a 16:0/22:6 és a 18:0/18:2 kísérletében. A 16:0/16:0 és a 18:0/22:6 kis mennyiségben volt jelen összehasonlítva a melegebb testhőmérsékletű állatokkal. A 16:0/16:0 PC speciesz szintje növekvő tendenciát mutatott a hideg-adaptált haltól a madárig haladva (5%-tól 30%-ig). Ezzel párhuzamosan a 16:0//22:6 PC mennyisége folyamatosan csökkent a testhőmérséklet növekedésével.

Az hideghez szokott hal foszfatidil-etanolamin frakciójában a legfőbb specieszek a 18:0/22:6, 18:1/22:6 és a 16:0/22:6 voltak. A környezeti vagy a testhőmérséklet növekedését a 18:0/22:6 szint növekedése, és a 18:1/22:6, 18:1/20:4 ill. 16:0/22:6

csökkenése kísérte. A 16:0/20:4 mennyisége alig tért el a különböző gerincesekben, míg a 18:0/20:4 koncentrációja jóval magasabb volt a homeotermekben, mint a poikilotermekben. Ezek az eredmények hasonlítanak a dolgozat korábbi részeiben bemutatottakkal.

A különböző gerincesek szinaptikus plazmamembránjaiba ágyazott DPH-PA és TMA-DPH "steady-state" fluoreszcencia anizotrópia paramétereit (R_{ss}) megmérve, úgy találtuk, hogy a fluiditás adaptálódása eltérő volt a két különböző fluoreszcens jelölő használata esetén. A DPH-PA-val mért anizotrópia paraméterek majdnem azonosak voltak a vizsgált fajokban a testhőmérsékleten mérve. TMA-DPH-t használva hasonló anizotrópia értékeket csak a nyári és téli hőmérséklethez adaptálódott halak mutattak, míg a patkány és a madár esetén majdnem azonos anizotrópia paramétereket kaptunk 20°C és 10°C-on mérve. A DPH-PA és a TMA-DPH a lipidek és a vizes fázis határfelületén található. A mi kísérleti körülményeink között (rövid inkubációs idők) mindkét jelölő a membrán külső rétegében található. Egy, a DPH-PA és a TMA-DPH közti fontos különbség, hogy az előbbi pozitív, míg az utóbbi negatív töltésű. A TMA-DPH-val kapott R_{ss} értékek konzisztensen alacsonyabbak voltak a DPH-PA-val kapottaknál. A TMA-DPH a membrán C_{8-10} , míg a DPH-PA a C_{10-12} szegmensét jelöli, s mivel az ismert, hogy a zsírsavláncok metil vége felé nő a rendezetlenség, és a DPH-PA rendezettebb struktúrákat jelez, mint a TMA-DPH, valószínű, hogy ez a különbség a próbák különböző vertikális elhelyezkedéséből adódik. A TMA-DPH, kationos természeténél fogva, a negatív töltésű foszfolipidekben gazdag, külső rétegről tudósít, míg a DPH-PA, ebből a környezetből kizorítva, a semleges, vagy pozitív töltésű régiókban található. Sajnos arra vonatkozólag jelenleg nem állnak rendelkezésünkre adatok, hogy szinaptikus plazmamembrán külső és belső rétegében milyen a foszfolipidek megoszlása. Mivel a DPH-PA és a TMA-DPH R_{ss} értékei közti különbség kisebb a halak között, mint a patkányban és a madárban, feltehetőleg a halak és a melegvérű állatok szinaptikus membránjai külső rétegének foszfolipid összetétele különböző.

Egy következő kísérletben három vezikula populációt készítettünk PDPC-ből (16:0/22:6), POPC-ből (16:0/18:1) és DPPC-ből (16:0/16:0). Egyet, ami a halak szinaptikus plazmamembránját reprezentálja (PDPC, 53% + POPC, 35% + DPPC, 12%), egyet, ami a patkányét (PDPC, 35% + POPC, 45% + DPPC, 20%), s a harmadik a madarét (PDPC, 28% + POPC, 37% + DPPC, 35%). Mivel a DPH-PA a membrán külső rétegének

rendezettségét jelzi, és a PC a legfőbb alkotója ezeknek a membránoknak, úgy gondoljuk, hogy az eredmények nagyjából megvilágítják a tapasztalt változások biológiai szignifikanciáját. A halszerű PC kombináció a legkevésbé rendezett, legfluidabb vezikulákat eredményezte, míg a madárszerű kombináció adta a legrendezettebb, legkevésbé fluid vezikulákat, alacsony mérési hőmérsékleten. Magasabb hőmérsékleten mérve ezek a különbségek csökkennek.

Modell kísérleteinkben a három legfőbb PC molekulaspeciesz aránya megközelítette a natív membránban található viszonyokat. Úgy találtuk, hogy a 16:0/16:0 PC speciesz mennyiségének változtatása az acilláncok rendezettségének hasonló megváltozását eredményezte, mint az a natív szinaptikus plazmamembránokban látható a hőmérséklet evolúció / adaptáció során alacsony mérési hőmérsékleten. Azonban a kompenzáció ezekben a mesterséges membránokban jóval 100% alatt maradt, amit a natív szinaptikus membrán esetén megfigyeltünk. Mivel az R_{ss} vs. hőmérséklet görbék 10°C felett átfednek a halszerű (12% DPPC) és a patkányszerű (20% DPPC) vezikulák esetén, valószínű, hogy egyedül a DPPC, egy kritikus koncentráció alatt, nem vesz részt a membránszerkezetek hőmérséklet kompenzációjában. A jelentős különbség az intakt és mesterséges membránok adaptációja között felveti a lehetőségét, hogy más membrán komponensek is részt vesznek a tapasztalt homeoviszkozus adaptációban.

A szituáció ettől eltérő lehet a szinaptikus membránok TMA-DPH-val jelzett régióiban, melyek részleges kompenzációt mutattak a patkányoknál és a madaraknál. Sajnos nincsenek adataink a membrán külső részében található foszfatidil-szerin molekulaspecieszeket illetően, s így nehéz a kapott eredményeket bármely speciesznek betudni. Ilyen különbségeket nem lehet DPH-val detektálni, ami a hidrofób mag átlagos fluiditását reprezentálja. Kísérletek folynak a membrán külső és belső rétegében található legfőbb foszfolipidek molekulaspeciesz összetételének meghatározására.

A legfőbb különbség az extrahált foszfolipidek és az intakt membránok között a fehérjék jelenléte az utóbbiban. Az 1-monoén, 2-polién PE specieszek egyik funkcionális szerepe talán a csökkenő hőmozgás miatt előforduló bilayer kontrakció megelőzése, és ezáltal a nagyfokú rendezetlenség fenntartása hidegben. Feltételezzük, hogy bizonyos nem-lipid komponensek, mint a membránfehérjék a felelősek a hőmérsékletadaptáció megfigyelt magas fokáért. Specifikus szerkezetüknek köszönhetően, és a bilayer pakoltsági tulajdonságaira kifejtett hatásuk miatt ezek a foszfatidil-etanolamin specieszek

hozzájárulhatnak a fehérjék megfelelő konfigurációinak fenntartásában kifejtett hatásukhoz. A foszfatidil-kolinok (16:0/18:1 vagy 16:0/22:6) nem rendelkeznek hasonló tulajdonságokkal, ezért ezek pusztán a membrán mátrixaiként szolgálnak. Minden valószínűség szerint a lipidkomponensek és a fehérjék együttes hatása manifesztálódik a hőmérséklet-adaptáció jelenségében, azonban a pontos funkciók felderítése még további vizsgálatokat igényel.

Az elfogadott cikkek és publikációk listája

*-gal jelölve az értekezés tárgyát képező publikációk

Fish Erythrocytes as a Tool to Study Temperature-Induced Responses in Plasma Membranes

I. Dey; T. Szegletes; **Cs. Buda**; J. Nemcsók and T. Farkas

Lipids 28, 743-746 (1993)

Molecular and Structural Composition of Phospholipids in Livers of Marine or Freshwater Fish in Relation to Temperature

I. Dey; **Cs. Buda**; T. Wiik; J. E. Halver and T. Farkas

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7498-7502 (1993)

* Role of Phospholipid Molecular Species in Maintaining Lipid Membrane Structure in Response to Temperature

T. Farkas; I. Dey; **Cs. Buda** and J. E. Halver

Biophysical Chemistry 50, 147-155 (1994)

* Structural Order of Membranes and Composition of Phospholipids in Fish Brain Cells during Thermal Acclimatization

Cs. Buda; I. Dey; N. Balogh; L. Horváth; K. Maderspach; M. Juhász and T. Farkas

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 8234-8238 (1994)

Role of Phospholipids Containing Docosahexaenoyl Chains in Modulating the Activity of Protein Kinase C

J. Giorgione, R. M. Epand, **Cs. Buda** and T. Farkas

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 9767-9770 (1995)

Molecular Architecture and Biophysical Properties of Phospholipids During Thermal Adaptation in Fish: An Experimental and Model Study

E. Fodor, R. H. Jones, **Cs. Buda**, K. Kitajka, I. Dey and T. Farkas

Lipids 30, 1119-1126 (1995)

* Role of Membrane Lipids in Temperature Acclimation of Carp

Cs. Buda, I. Dey and T. Farkas

Arch. Anim. Nutr. 49, 61-62 (1996)

The Mechanism of Inhibitory Effect of Eicosapentaenoic Acid on Phagocytic Activity and Chemotaxis of Human Neutrophil Granulocytes

S. Sipka, I. Dey, Cs. Buda, J. Csongor, Gy. Szegedi and T. Farkas

Clinical Immunology and Immunopathology 79, 224-228 (1996)

* Involvement of Phospholipid Molecular Species in Controlling Structural Order of Vertebrate Brain Synaptic Membranes During Thermal Evolution

K. Kitajka, Cs. Buda, E. Fodor, J. E. Halver and T. Farkas

Lipids, (submitted)

Large Amount of Didocosahexaenoyl Phospholipid in Fish Sperm

M. V. Bell, Cs. Buda, J. R. Dick and J. C. Navarro

Lipids, (submitted)