

Farkas Tibor
az MTA rendes tagja

MEMBRÁNFOSZFOLIPIDEK MOLEKULÁRIS ÖSSZETÉTELE ÉS A TESTHŐMÉRSÉKLET

Elhangzott 1998. október 20-án

A biológiai folyamatok jelentős hányada valamilyen felületen játszódik le, mely felületek egyik fontos építőelemei a foszfolipidek. A biomembránok lipidtartalma 15–40% között változhat. A Singer–Nicholson-membránmodell szerint (*Singer és Nicholson, 1972*) a fehérjék lipidek „tengerébe” vannak beágyazva, és értelemszerűen ezen fehérjék funkciói, enzimek aktivitásviszonyai vagy a membránok permeabilitása a környező lipidmolekulák milyenségének, ill. mozgásviszonyainak is függvényei. E szerkezetek lipidösszetételét számos külső és belső tényező módosíthatja, pl. bioszintetikus folyamatok vagy a táplálékkal felvett zsírsavak. A sejtek egyik alapvető törekvése az, hogy membránjaiknak szerkezeti és funkcionális integritását fenntartsák, pl. oly módon, hogy membránlipidjeik összetételét úgy módosítják, hogy az az adott körülmények között optimális működést tegyen lehetővé.

A Singer–Nicholson-membránmodellből az is következik, hogy a membránok egy ún. „liquid-kristályos” állapotban vannak a test hőmérsékletén, és ezért a sejteknek konstans fluiditási állapotot kell fenntartaniuk változó környezeti körülmények között. A környezet hőmérséklete az egyik legfontosabb tényező, mely a hideg vérű szervezetek aktivitását, szezonális előfordulását és

geográfiai elterjedését befolyásolja. Ezeknek a szervezeteknek haladéktalanul válaszolniuk kell a környezet hőmérsékletének változásaira, hacsak nem találtak valami más módot, pl. inaktív állapot, téli álom stb., ilyen hatások kivédésére. A válasz pedig a legtöbb esetben a membránalkotó lipidmolekulák megfelelő átstrukturálása. Egy ilyen átrendezés egy csomó folyamat megszervezését kívánja meg a sejtektől, mint pl. megfelelt lipidek/zsírsavak „legyártása”, azoknak a már meglévő foszfolipid-molekulákba való beépítése vagy a foszfolipid-fejcsoportok arányainak megváltoztatása.

A membránok homeoviszkozus adaptációja

Herodek Sándor kollégámmal talán mi voltunk az elsők (Farkas és Herodek, 1964), akik kimutatták, hogy egyes vízi szervezetek lipidjeik összetételét és olvadáspontját úgy képesek módosítani, hogy pl. az olvadáspont mindig néhány °C-kal alatta legyen a környezet hőmérsékletének. Ezen eredmények közlése után kb. 15 évvel dr. Sinensky végzett kísérleteket *E. colival*, s a sejteket különböző hőmérsékleteken tenyésztette, és azt a megállapítást tette, hogy a sejtekből kinyert foszfolipidek thermotrop fázisváltzási hőmérséklete (ahol a rendszer egy merev, gélszerű állapotba megy át) pontosan követte a tenyésztési hőmérsékletet, vagyis: az minél alacsonyabb volt, a fázisátmenet is annál alacsonyabb hőmérsékleten történt, de a tenyésztés hőmérsékletén mért mikroviszkózítások azonosak maradtak. Ezt ő „homeoviszkozus adaptáció”-nak nevezte el (Sinensky, 1974). Az *E. coli* zsírsavösszetétele igen egyszerű, foszfolipidjeit csupán néhány telített és kizárólag egyszer telítetlen zsírsav építi fel. A prokariótákkal szemben a legtöbb soksejtű változó hőmérsékletű és meleg vérű eukarióta szervezet foszfolipidjei sokkal bonyolultabb felépítésűek, azokban általában 10-20-féle különböző zsírsav fordul elő, melyeknek telítetlenségi foka 0 és 6 kettős kötés között, lánchosszuk pedig 14 és 22 szénatom között változhat. Ha figyelembe vesszük, hogy egy foszfolipid-molekulát csak 2 zsírsav észterezhet, akkor csupán egyfajta foszfolipidből 2^{10-20} -félével kell manipulálniuk ezen szervezetek sejteinek, de a képlet tovább komplikálódik akkor, ha azt is meggondoljuk, hogy a membránokban 5-8 különböző fejcsoportú foszfolipid fordul elő. A legfontosabb környezeti tényező, mellyel bármilyen változó testhőmérsékletű szervezet szembe találja magát, a környezet hőmérséklete, mely változhat napszakosan, évszakosan, a mély vízi tavakban/tengerekben vertikálisan vagy éppen kiszámíthatatlanul. A hőmérsékletet úgy is tekinthetjük, mint egy membránperturbánst, a membránokat pedig mint valamilyenfajta szenzorokat, melyek foszfolipidjeik, ill. zsírsavaik révén azonnal jelzik a környezet hőmérsékletében beállott változásokat.

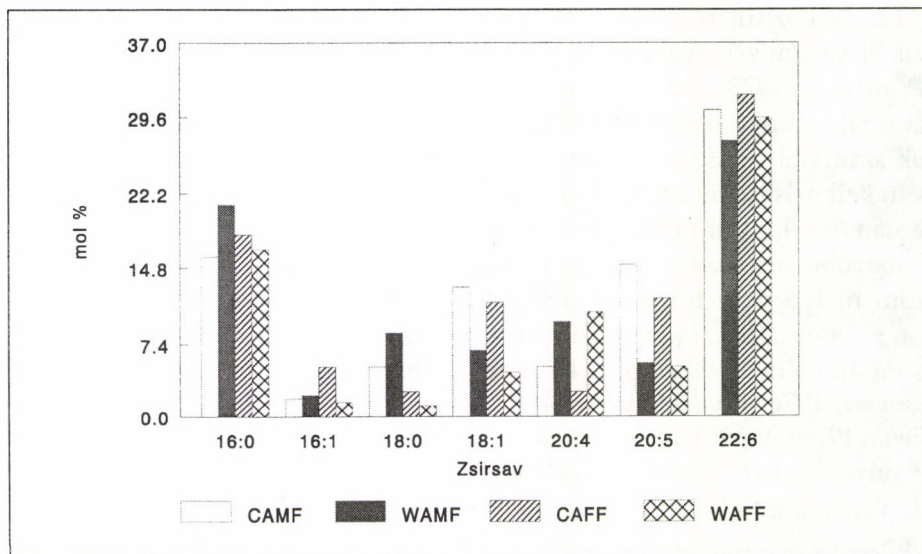
Eléggé közismert az a tény, hogy minél alacsonyabb hőmérsékleten növekszik/él valamilyen szervezet, annál telítetlenebbek a lipidjei, és megfordítva (Precht et al., 1973; Hazel és Prosser, 1974). A zsírsavak membránfluidizáló hatását azzal a ténnyel hozták összefüggésbe, hogy olvadáspontjuk a telítetlen kötések számával szinte lineárisan csökken. Így a poikilotherm szervezeteknek nem kell mást tenniük, mint pl. a külső hőmérséklet csökkenésével párhuzamosan növelni kell a foszfolipidjeikben a telítetlen zsírsavak arányát. A legkülönbözőbb vízi szervezetekben a legtelítetlenebb zsírsav lánchossza 22 szénatom, melyben 6 kettős kötés foglal helyet (dokozahexaensav, [22:6 ω 3]). Valóban számos adat azt bizonyítja, hogy pl. kísérletes körülmények között, alacsony hőmérsékleteken pl. a halakban e zsírsav szintje növekszik (Farkas és Csengeri, 1976; Caldwell és Vernberg, 1970; Knipprath és Mead, 1966; Kemp és Smith, 1970). Valójában azonban a kérdés sokkal bonyolultabb. A foszfolipidek bizonyos, a membránok működése szempontjából fontos paraméterei, mint pl. olvadáspontjuk (vagy a folyékony-kristályos-merev gél fázisátmeneti hőmérsékletük), az általuk a membránokban elfoglalt felületük nem lineáris függvényei az őket észterező zsírsavak telítetlenségi fokának. Kimutatták, hogy mindkét paraméterben akkor következik be a legdrasztikusabb változás, amikor a molekulába az első cisz kettős kötés beépül (Coolebar et al., 1983; Evans et al., 1987), további kettős kötések már csak kismérvű változást eredményeznek, és a 6. kettős kötés beépítésének már alig van jelentősége.

Foszfolipidek a májban és a testhőmérséklet

Azt, hogy a telítetlen zsírsavak abszolút mennyiségének termoadaptációs szempontból nem sok jelentősége van, úgy bizonyítottuk be, hogy kimutattuk, az evolúciósan alacsony (5-6 °C), ill. magas hőmérsékletekhez adaptálódott tengeri vagy édesvízi halak foszfolipidjeiben a [22:6 ω 3] szintje közel azonos volt. Viszont jellegzetes különbségek adódtak az olajsav szintjében, mely mindkét hideghez adaptálódott csoportban sokkal magasabb volt, mint a meleghez adaptált társaikban (1. ábra).

Ez különösen az egyik foszfolipid, a foszfatidiletanolamin tekintetében volt különösen kirívó, és nemcsak a halak, hanem pl. garnélarákok esetében is (Dey, et. al., 1987).

Mint említettük, a membránokban számtalan, több száz foszfolipid-féleség, molekulaspecies fordul elő amiatt, hogy egy foszfolipid-molekulában csak két zsírsav helyezhető el, de a jelenlevő zsírsavak száma igen nagy. Ma már adva vannak a technikák, hogy ezeket a molekulaspecieseket legalább nagyjából szétválaszthatjuk. Ilyen típusú elemzések azt a meglepő eredményt hozták,



1. ábra. Májfoszfolipidek zsírsavösszetétele.

CAMF: hidegadaptált tengeri hal; CAFF: hidegadaptált édesvízi hal;
WAMF: melegadaptált tengeri hal; WAFF melegadaptált édesvízi hal

hogya a környezet hőmérsékletének csökkenésével csupán néhány molekula-species aránya növekszik, mégpedig azoké, amelyekben a foszfolipid glicerinvázának sn-1 szénatomjához egy monoén, az sn-2 szénatomjához pedig egy többszörösen telítetlen zsírsav, a legtöbb esetben [22:6 ω 3] kapcsolódik (Fodor et al., 1995). Ez a tény a legkülönbözőbb összefüggésekben is igaznak tűnik, pl. arktikus tengeri és édesvízi halak mája, agya (Dey et al., 1993; Buda et al., 1994) vagy garnélarákok (Farkas et al., 1994), de még fonalférgek esetében is (Tanaka et al., 1996) (1. táblázat).

1. táblázat

Néhány foszfatidiletanolamin-species meleghez és hideghez adaptált szervezet májában, hepatopankreaszában

	MAÉH	HAÉH	MATH	HATH	GARNÉLA ¹	GARNÉLA ²
18:1/20:5	–	0,9	0,5	3,6	4,8	20,1
18:1/22:6	5,4	10,2	6,5	20,4	7,6	23,2
18:1/20:4	4,8	17,4	–	–	2,7	2,4
16:0/22:6	23,1	15,8	23,3	23,1	13,3	19,5
18:0/22:6	17,0	6,2	7,5	2,5	19,6	1,8

MAÉH: meleghez adaptált édesvízi hal; HAÉH: hideghez adaptált édesvízi hal;
GARNÉLA¹: származási hely Egyiptom; GARNÉLA²: származási hely Norvégia

Nyilvánvalóan ez a molekulaszpecifikus olyan kiváló tulajdonságokkal rendelkezik, melyek alkalmassá teszik a membránok biofizikai paramétereinek hőmérsékletfüggő szabályozására. Pontosabban abban az időben, amikor mi ezeket a megfigyeléseket tettük, egy orosz kutatócsoport a különböző foszfolipid-molekulaszpecifikus geometriai viszonyait tanulmányozta. Kimutatták pl., hogy a 18:1/22:6 szpecifikus sokkal nagyobb térigényű, mint a 18:0/22:6 szpecifikus (Zabelinskii et al., 1995), sőt még azt is, hogy a [22:6 ω 3] beépítése a molekulába nemhogy növeli, de csökkenti a molekulák térigényét (2. táblázat).

Ezt azzal a ténnyel lehet összefüggésbe hozni, hogy a [22:6 ω 3] molekulában egy pálcika alakú konformációt vesz fel (Applegate és Gloomeset, 1991), amely miatt az ilyen foszfolipidek, ill. a belőlük képzett membránok még kontrahálódnak is. A kép tovább bonyolódik akkor, ha figyelembe vesszük, hogy a membránokban egyéb foszfolipidek is vannak, és ezek bonyolult kölcsönhatásokra képesek, így pl. kimutatták, hogy foszfatidiletanolaminok tovább csökkentik a foszfatidilkolin-molekulák által elfoglalt felületet (Garwisch és Holte, 1996). A környezeti hőmérséklet csökkenésével a zsírsavláncok mozgékonyasága csökken, és a membránokban a fokozódó hidrofób kölcsönhatások miatt a foszfolipid-molekulák egyre közelebb kerülnek egymáshoz, más szóval a membránok tömítettsége növekszik. Nyilvánvalóan a foszfatidiletanolamin és a foszfatidilkolin sn-1 helyzetébe beépített egyetlen cisz kettős kötés többek között ennek hat ellenébe.

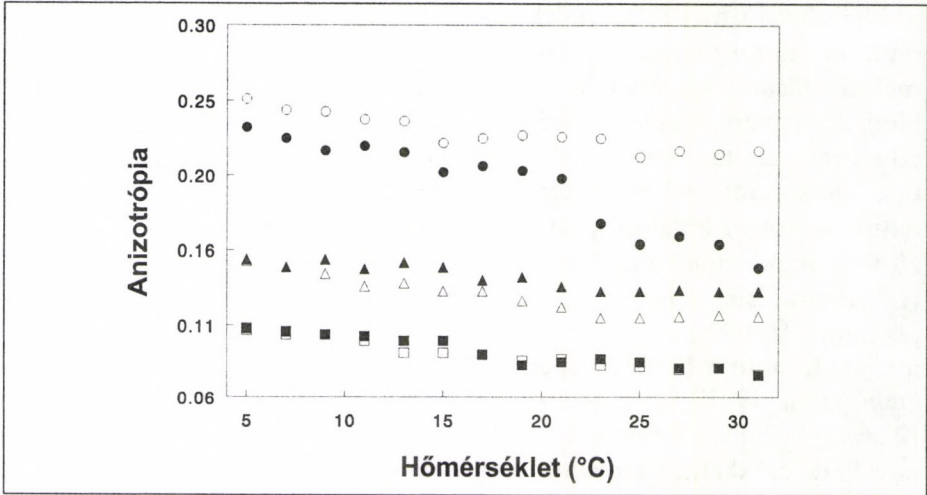
Hideghez (5 °C) és meleghez (22 °C) adaptált édesvízi halak (*C. Carpio*), arktikus (*Ophiodon elongatus*) és szubtrópusi (*Nemipterus hexodon*) eredetű tengeri halak májából (5–6 °C, ill. 25–27 °C) és arktikus (*Pandulus borealis*) és mediterrán (*Parapandulus sp.*) régióból származó dekapoda rákok (2 °C, ill. 22 °C) hepatopankreaszából izolált foszfolipid vezikulákon végzett fluiditásmérések eredményei egybeesnek a fenti gondolatmenettel (2., 3. ábra).

Ezeket a méréseket különböző anthroxyloxy zsírsavak segítségével végeztük, melyek ebben az esetben a vezikulák C-2, C-12 és C-16 régiójának rendezettségéről adtak információt. A hidegadaptált állatok membránjainak C-2 régiója minden esetben rendezetlenebbnek bizonyult, mint a meleghez adaptált állatok membránjainak hasonló régiója, és ugyanez igaz a *C. carpio* membránjainak

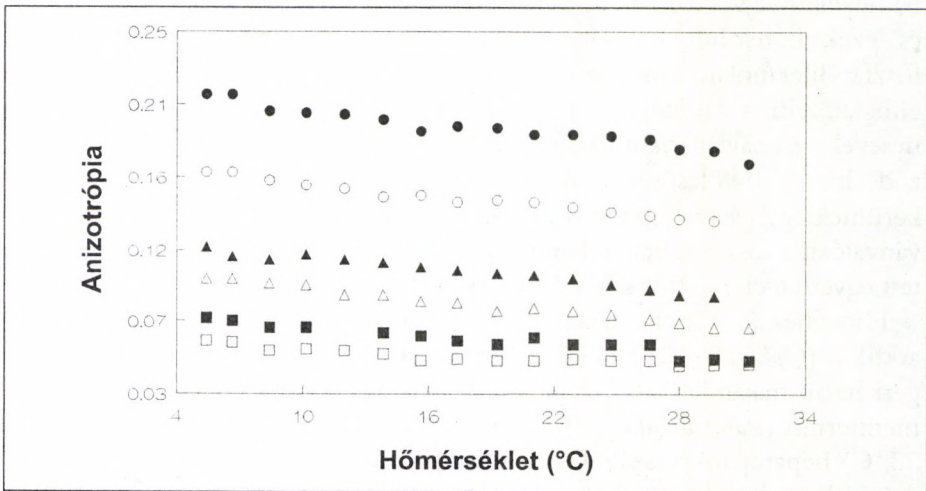
2. táblázat

Különböző foszfolipid-molekulaszpecifikus által elfoglalt tér membránokjában képzett vetületének nagysága (Zabelinskii et al., 1995 alapján)

	Terület (Å ²)
16:0/16:0	71,49
18:0/18:0	67,87
18:1 ω 9/22:6 ω 3	102,61
18:0/22:6 ω 3	79,62
18:0/20:4 ω 3	85,96
16:0/22:6 ω 3	82,88



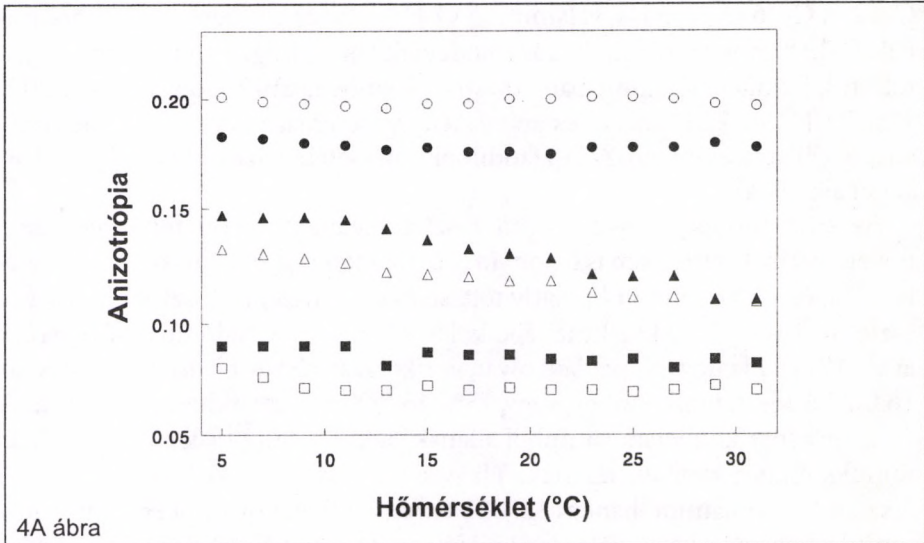
2. ábra. 2-, 12(9-anthroyloxy) sztearin (2-, 12-AS) és 16-(9-anthroyloxy) palmitinsav (16-AP) fluoreszcencia-anizotrópiája arktikus és szubtrópusi eredetű halak máj-foszfolipidjeiből készült vezikulákban. Üres szimbólumok: Ophiodon elongatus, zárt szimbólumok: Nemipterus hexodon. ●, ○: 2-AS; ▲, △: 12-AS; ■, □: 16-AP



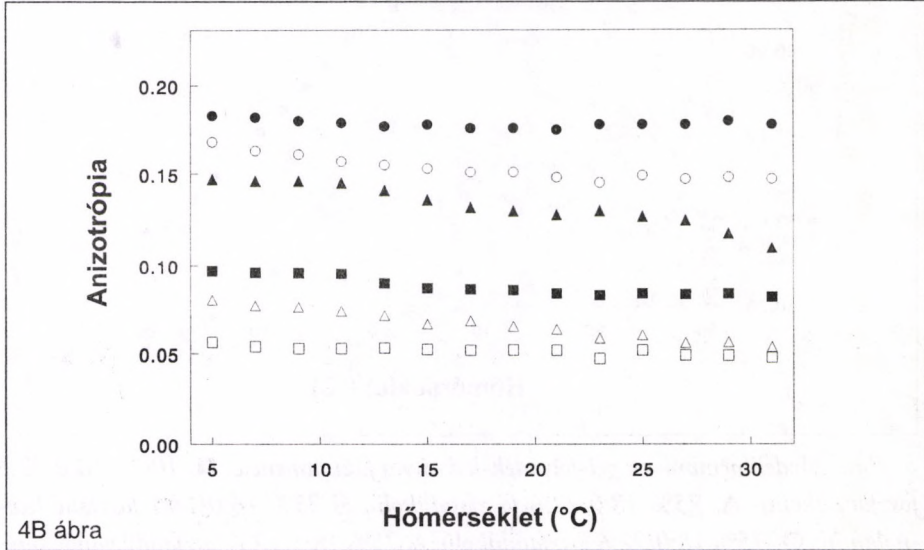
3. ábra. 2-, 12(9-anthroyloxy) sztearin (2-, 12-AS) és 16-(9-anthroyloxy) palmitinsav (16-AP) fluoreszcencia-anizotrópiája arktikus és mediterrán régióból származó rákok hepatopankrasz-foszfolipidjeiből készült vezikulákban.

Üres szimbólumok: Pandulus borealis, zárt szimbólumok: Parapandulus sp.

●, ○: 2-AS; ▲, △: 12-AS; ■, □: 16-AP



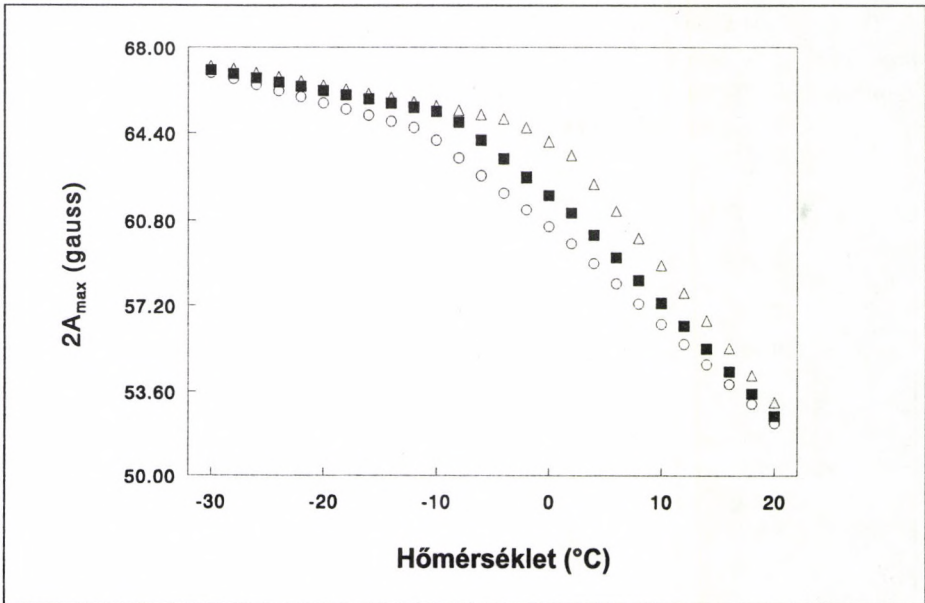
4. A–B ábra. 2-, 12(9-anthroyloxy) sztearin (2-, 12-AS) és 16-(9-anthroyloxy) palmitinsav (16-AP) fluoreszcencia-anizotrópiája szintetikus lipidkeverékből készült vezikulában. A) tömör szimbólumok: 100% 16:0/22:6 foszfatidilkolin, üres szimbólumok: 75% 16:0/22:6 foszfatidilkolin és 25% 16:0/18:1 foszfatidiletanolamin. B) tömör szimbólumok: 100% 16:0/22:6 foszfatidilkolin, üres szimbólumok: 75% 16:0/22:6 foszfatidilkolin és 25% 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin



4B ábra

C-12 és C-16 régiójára is, valamint az *O. elongatus* és a *P. borealis* membránjainak C-12 régiójára is. Ami közös mindegyik fajnál, hogy a hidegadaptált állatok foszfatidiletanolaminjában az sn-1 monoén, sn-2 polyén (18:1/20:5, 18:1/20:4, 18:1/22:6) speciestek aránya lényegesen magasabb, mint a meleghez adaptált állatok esetében. A foszfatidilkolinok esetében hasonló a helyzet (Farkas et al., 1974).

Az sn-1 monoén, sn-2 polyén foszfatidiletanolaminok rendezetlenség-növelő hatása kísérletesen is bizonyítható. Ez a tény egyébként ismert az irodalomból, és azt az amino N pozitív töltése és a szomszédos foszfolipid foszfátészter negatív töltése között fellépő kölcsönhatásnak tulajdonítják (Michaelson et al., 1974). Ha ugyanis például olyan vezikulákat készítünk, melyek vagy csak 16:0/22:6 foszfatidilkolinból, vagy 75% 16:0/22:6 foszfatidilkolinból és 25% 16:0/18:1 foszfatidiletanolaminból állanak, akkor az utóbbiak a C-2 régióban mindig rendezettebbek lesznek. Ha viszont a vezikulákba nem 16:0/18:1 foszfatidiletanolamint, hanem 18:1/22:6 foszfatidiletanolamint építünk, megfordul a helyzet: a vezikulák a C-2 régióban, de még a C-12 régióban is sokkal rendezetlenebbekké válnak (4. A és B ábra).



5. ábra. Modellmembránok gél-folyadék-kristályos fázisátmenete. ■: 100% 18:0/22:6 foszfatidilkolin; Δ: 75% 18:0/22:6 foszfatidilkolin és 25% 16:0/18:1 foszfatidiletanolamin; ○: 75% 18:0/22:6 foszfatidilkolin és 25% 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin

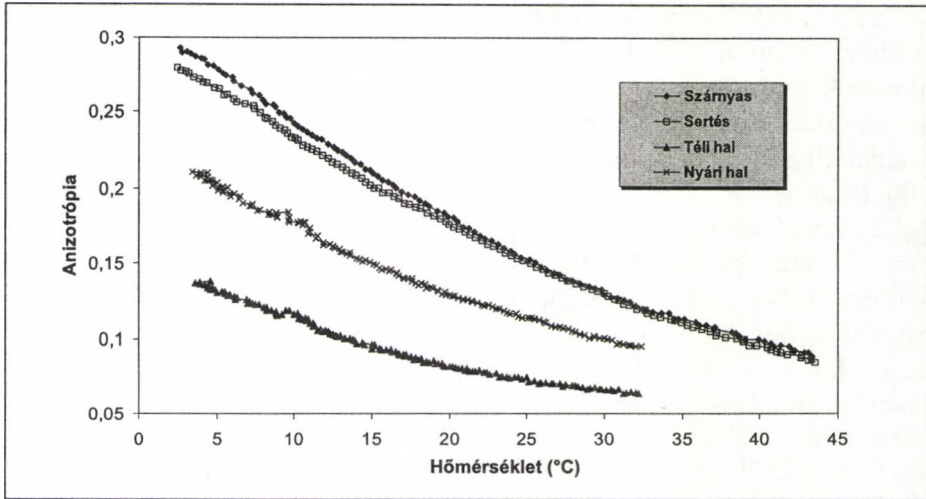
Ez a foszfolipid nemcsak a rendezettségi viszonyokat szabályozza, hanem a rendszer thermotrop fázisváltozási hőmérsékletét is. Modellkísérletekben kimutattuk, hogy azoknak a vezikuláknak a liquid-kristályos merevgél-fázisátmenete alacsonyabb hőmérsékleti régiók felé tolódik el, amelyekbe 18:0/22:6 foszfatidilkolin mellé mintegy 25% 18:1/22:6 foszfatidiletanolamint építettünk (5. ábra).

Ez a hőmérséklet-különbség a 25% 16:0/18:1 foszfatidiletanolamint tartalmazó vezikulákkal összehasonlítva mintegy 8 °C (Fodor et al., 1995). Semmiféle egyéb módosítás a foszfolipidek molekulaspecies-összetételében nincs hatással a fluiditásviszonyokra. Ha pl. patkányokat hónapokon keresztül magas linolsav- [18:2 ω 6], ill. magas [22:6 ω 3]-tartalmú diétán tartottunk, akkor az utóbbiak májának foszfatidiletanolaminjaiban és foszfatidilkolinjaiban a 18:0/20:4, és 18:0/22:6 specieszek aránya jelentősen megnövekedett, a foszfolipidekből készített vezikulák rendezetlensége mégis azonos maradt (Farkas et al., 1974).

A máj metabolikusan egy aktív szövet, zsírsavösszetételét számos tényező befolyásolhatja, többek között a táplálék. Mégis ez utóbbi hatását nagy valószínűséggel ki lehet zárni a fenti válaszok értelmezésekor, hiszen mindegyik hal tápláléka más lehetett. Így ezekből az eredményekből vonzónak látszik azt a következtetést levonni, hogy az sn-1 monoén, sn-2 polyén foszfolipidek, de különösen a foszfatidiletanolaminok aránya és a testhőmérséklet között szoros kapcsolat lehet.

Foszfolipidek a központi idegrendszerben

Mégis, hogy kizárjunk mindenféle lehetséges diétás hatást, hasonló vizsgálatokat végeztünk a központi idegrendszer lipidjein is. Az emlősök központi idegrendszere tudvalevően igen rezisztens mindenféle ilyen hatásra, kivéve az intrauterin élet utolsó harmadáig eltelt időszakot. Viszont igen gazdag [22:6 ω 3] zsírsavban. A halak agyveleje, ámbár fejlődése nem fejeződik be az embrionális élet végével, hanem még több hónapon keresztül tart, szintén gazdag ugyanebben a zsírsavban, melynek arányát irodalmi adatok szerint (Pagliarani et al., 1986) és saját megfigyeléseink alapján (Roy et al., 1998) érdekes módon szintén nem lehet diétás úton befolyásolni. De egy hal és egy emlős agyának [22:6 ω 3] szintje között van különbség olyan értelemben, hogy az előbbiek agya gazdagabb ebben a zsírsavban. Jelentős eltérések vannak a különböző testhőmérsékletű halak agyának zsírsavösszetétele között olyan értelemben, hogy evolúciósan alacsony hőmérséklethez (boreális régiók) adaptálódott halak agyában a [22:6 ω 3] szintje magasabb (28,7), mint a szub-



6. ábra. Agyi foszfolipidek fluiditása evolúciós viszonylatban

tópusi körülmények között élő halak agyában (19,8), míg a mérsékelt égövi halak agyának [22:6 ω 3] tartalma a két érték közé esik. Érdekes módon azonban, a mérsékelt égövi halak agyában a [22:6 ω 3] szintje a testhőmérséklet szerint és a májknál már megismert módon változik (21,7, ill. 23,5 nyári, ill. téli akklimatizáció). Minthogy azonban ezek a halak alacsony hőmérsékletek mellett nem táplálkoznak, e válaszok nem vezethetők vissza diétás okokra.

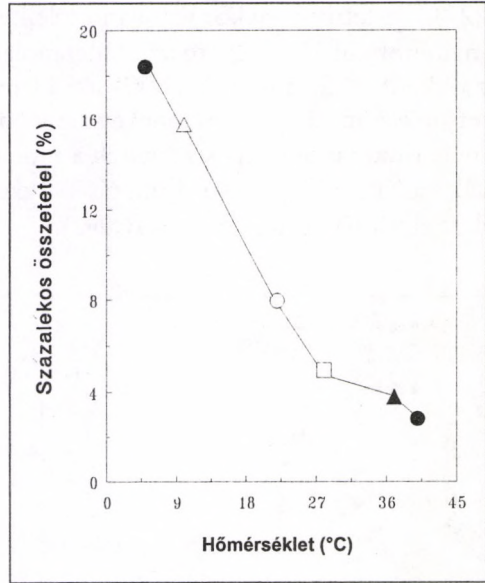
A különböző eredetű agyak foszfolipidjeiből képzett vezikulák fluiditása a testhőmérsékletéhez igazodik, vagyis az emlősök és madarak agyának foszfolipidjei merevebb vezikulákat képeznek, mint a meleg vízhez vagy hideg vízhez adaptált halakéi (6. ábra).

Összehasonlítva a testhőmérsékleteken mért fluiditásértékeket, kitűnik, hogy azok nagyjából azonosak, ami a foszfolipidek szintjén egy 100%-os kompenzációt sejtet. Behan-Martin és munkatársai a törzsfajlás különböző szintjein élt és így eltérő klimatikus körülmények között élő gerincesek agyának szinaptikus vezikuláinak fluiditását vizsgálva hasonló eredményeket kaptak (Behan-Martin et al., 1993).

Bár a fenti szerzők nem végeztek részletes vizsgálatokat a szinaptikus vezikulák lipidjein, saját méréseink azt látszanak igazolni, hogy kapcsolat lehet, a májhoz hasonlóan, a foszfolipidek molekuláris összetétele, a foszfolipid-vezikulák fluiditása és a testhőmérséklet között. Figyelembe véve, hogy a szinaptikus vezikulák diacil foszfolipidjeinek és az agy összes diacil foszfolipidjeinek molekulaspecies-összetétele majdnem azonos, a 7. ábrán az összes

rendelkezésre álló irodalmi és saját elemzési adataink alapján összehasonlítást végeztünk a foszfatidiletanolaminok összes 1-monoen-2-polyen speciestek szintje és a testhőmérséklet között a hideghez adaptált halaktól a madarakig.

Látható, hogy fordított viszony van a testhőmérséklet és e molekulaspeciestek mennyisége között. Más, itt nem részletezett mérések azt mutatják, hogy azoknak a molekulaspeciesteknek a mennyisége, amelyek [22:6 ω 3] zsírsavat tartalmaznak az sn-2 helyzetben (18:0/22:6+18:1/22:6), közel azonos a gerinces törzsfajlódás, ill. a testhőmérsékleti evolúció során. Egyelőre senki sem érti a [22:6 ω 3] kiemelt szerepét a központi idegrendszerben. A jelen eredményekből arra lehet következtetni, hogy a fenti molekulaspeciestek szerepet játszhatnak a központi idegrendszer működése, az agyi membránok strukturális integritásának és biofizikai paramétereinek meghatározásában. Erre utal az is, hogy azoknak az állatoknak tanulási készsége, amelyek [ω 3] zsírsavszegény diétán éltek, és így agyukban is alacsonyabb volt a [22:6 ω 3] szintje, elmaradt az [ω 3] zsírsavdús takarmányon tartott állatoké mögött (Bourre et al., 1984; Yamamoto et al., 1994). Egyes szerzők egyenesen arra is következtetésre jutottak, hogy az ember mentális apparátusának kvalitása még az intrauterin élet során dől el, és attól függ, hogy az agy mennyi [22:6 ω 3] zsírsavhoz jutott (Holman et al., 1991).



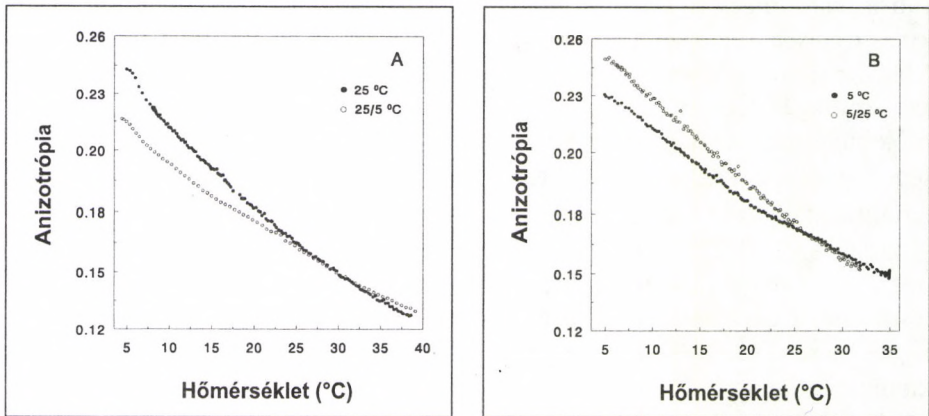
7. ábra. 1-monoen-2-polyen foszfolipidek mennyisége a testhőmérséklet függvényében.

●: téli ponty; Δ: pisztráng ; ○: nyári ponty;
□: trópusi hal; ▲: emlős; ●: madár

Foszfolipidek és hőmérsékleti stressz

Elvárható, hogy a fentebb az ún. „long term” adaptáció során szerkezetbeli és fluiditásbeli válaszokat hőmérsékleti stressz során is észleljük, abból kiindulva, hogy ezeknek a válaszoknak gyorsnak, reverzibilisnek kell lenniök, és nem szabad függeniök az állat hőmérsékleti előéletétől. E tétel bizonyítására tett erőfeszítéseink részleges sikert hoztak. Ha hidegadaptált halakat 2 napra

22 °C-ra tettünk, akkor valóban észlelhető elmozdulás történt pl. a májplazmamembrán 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin-szintjében: az ez idő alatt felére csökkent, és fordítva: ha 22 °C-hoz adaptált halakat ugyanennyi időre 5 °C-ra tettünk, e species aránya megkétszereződött. Ugyanezen plazmamembránból mért fluiditásviszonyok követték a molekulaspecies összetételében fent mért válaszokat: melegstressz fluiditás-csökkenést, hidegstressz fluiditás-növekedést eredményeztek (8. A és B ábra).

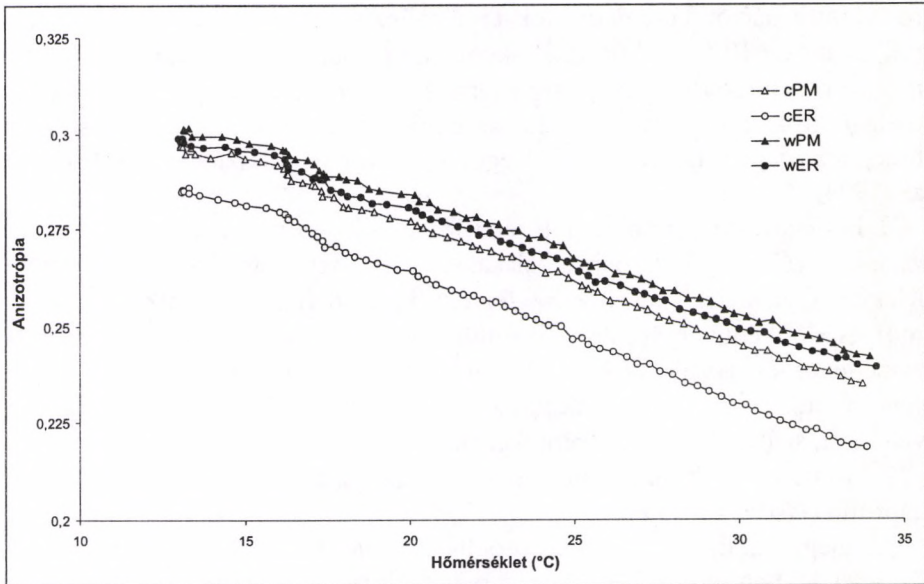


8. ábra. Hőmérsékleti stressz hatása májplazmamembrán fluiditásviszonyaira. 5 °C, ill. 25 °C a kiindulási, adaptációs hőmérséklet állapotát, 25/5 °C (A) pedig a hidegstressz, ill. 5/25 °C (B) a melegstressz állapotát jelöli

Halagyakból nem preparáltunk semmiféle membránt ehhez a kísérlethez, hanem csak az összes foszfolipidet vizsgáltuk: a 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin-szintje 8,4%-ról 10,8%-ra növekedett egy 2 napos hidegstressz és 18,4 %-ról 11,5 %-ra csökkent egy 2 napos melegstressz után. A fluiditásértékek ennek megfelelően változtak (adatokat nem mutatunk be).

Ha megvizsgáljuk a kompenzáció mértékét, kitűnik, hogy ezek a hatások a legtöbb esetben csak egy nagyon kis mérvű kompenzációt váltottak ki a plazmamembránban (és a többi intracelluláris membránban), vagyis ezekkel a fluiditásértékekkel csak nagyon kis mértékben tudták az állatok kivédeni a hőmérsékletnek a membránok rendezettségére gyakorolt hatását. Más szóval az ún. „homeoviszkozus hatékonyság” igen kis mértékű volt, legalábbis az általunk vizsgált rendszerben.

Nem lehetetlen, hogy élő sejtek élénkebb választ adnának. A kérdés eldöntésére több kísérletes megközelítést tettünk:



9. ábra. *Eltérő hőmérsékleten keltetett halikra plazmamembrán és endoplazmás retikulum fluiditása DPH fluoreszcens jelölő anizotrópia paramétere alapján. cPM és cER jelöli a hidegen (19 °C), wPM és wER a melegen (25 °C) kelt ikra plazmamembrán (PM) és endoplazmatikus retikulum (ER) membránjait*

1. Halikrákat két eltérő hőmérsékleten (25 °C és 19 °C) hagyunk fejlődni, és a frissen kelt lárvákból készített plazmamembrán és endoplazmás retikulum fluiditását vizsgáltuk DPH fluoreszkáló festéket használva. A barázdálódás 25 °C-on igen gyorsan lezajlott (24 óra), 19 °C-on kb. kétszer ennyi idő alatt. Mégis az alacsonyabb hőmérsékleten keltett lárvákból készített membránok fluidabbaknak bizonyultak, mint a 25 °C-on kelt lárvák membránjai (9. ábra). Ez arra mutat, hogy a barázdálódó sejtek membránjaik biofizikai paramétereit igen gyorsan hozzáigazítják a környezet hőmérsékletéhez.

Ezzel párhuzamosan a 19 °C-on barázdálódó ikrákban, ill. a kikelt lárvák plazmamembránjaiban vagy endoplazmás retikulumjaiban a 18:1/22:6 és a 18:1/20:4 foszfatidiletanolamin-szintje magasabb lett, mint a 25 °C-on barázdálódó ikrákban.

2. Neuronokat izoláltunk hideghez és meleghez adaptált halak agyából egy mások által már bejátszott technikával (Tocher és Sargent, 1992), a sejteket DPH-PA fluoreszkáló festékkel jelöltük. Ez a festék töltésénél fogva a plazmamembrán külső lemezében marad, nem hatol be a sejtbe, így annak fluiditására

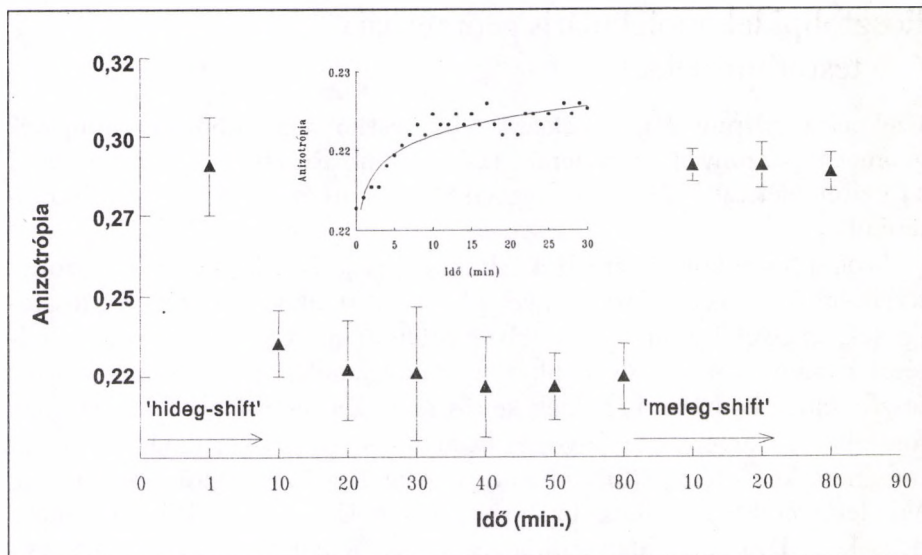
ról ad információt. Ha a neuronokat meleghez adaptált halak agyából készítettük, és azokat 10 °C-ra hűtöttük, akkor már 10 perc után jelentős növekedést mértünk a fluiditásban, ha pedig ugyanezen sejteket kb. 90 perc után visszamelegítettük, a fluiditás visszaállt az eredeti értékre. Ugyanezt a kísérletet hideghez adaptált neuronokon elvégezve, ellentétes választ kaptunk (Buda et al., 1994) (10. ábra).

3. Hideghez adaptált halak feji vénájába kanült vezetünk, úgy, hogy a kanül vége hozzáférhető volt, majd a halakat egy termosztálható akváriumba tettük. Megfelelő adaptációs idő után melegítettük, majd visszahűtöttük az akváriumot, és időnként vért vettünk a kanülon keresztül. A vérből izoláltuk a vörösvérsejteket, és ugyancsak DPH-PA-val jelöltük fluiditásmérés céljára. A 11. ábra mutatja, hogy a mért fluiditás a teshőmérsélet változásának megfelelően változott, szinte °C-nyi érzékenységgel.

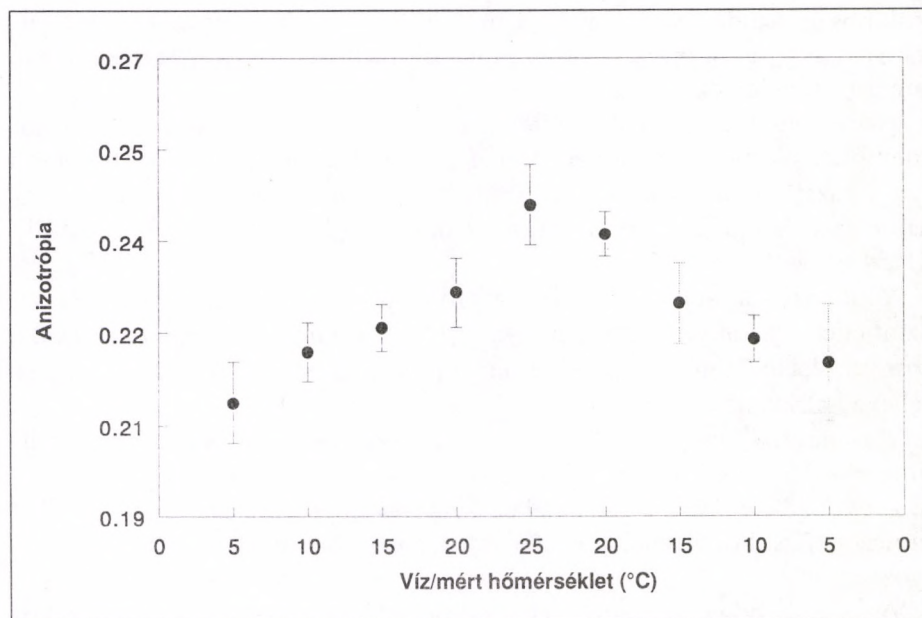
A kísérletet *in vitro* körülmények között megismételve, hasonló eredményt kaptunk (Dey et al., 1993).

Megjegyezzük, hogy a két utóbbi *in vitro* kísérletben a foszfolipid-összetételekben semmiféle változást nem tudtunk kimutatni, ami nem jelenti azt, hogy ezen a szinten nem történtek változások, csupán azt, hogy a technika nem volt elég érzékeny ilyen kismérvű változások detektálására. Ez utóbbi feltételezést az a korábbi kísérletünk is alátámasztja, melyben meleghez adaptált halmájszeleteket [^{14}C] olajsav és [^3H] palmitinsav jelenlétében inkubáltunk két szélsőséges hőmérsékleten (5 °C, 25 °C), és mértük a ^{14}C és ^3H arányát a foszfatidiletanolamin sn-1 pozíciójában. Kitűnt, hogy 5 °C-on már néhány óra elteltével ez az arány 0,5- ról 1,3-ra emelkedett (Farkas és Roy, 1989). Természetesen azt a lehetőséget sem lehet kizárni, hogy ezekben a gyors válaszokban egyéb, nem lipidtemészetű membránkomponensek (pl. fehérjék) is részt vesznek.

Felmerül az a kérdés is, hogy nem valami műterméket mértünk-e. Mindenféle meggondolás azonban azt sugallja, hogy mindkét esetben a sejtek aktív válaszáról van szó. Ha ui. csak a hőmérséklet passzív hatásáról volna szó, akkor a termodinamika törvényei szerint pont ellenkező effektussal találkoztunk volna: a hőmérséklet csökkenésekor a rendszereknek merevedni, növelésekor pedig fluidizálódni kellett volna. Egy további bizonyíték az aktív válasz mellett az, hogy hidegstressz hatására egy ún. delta-9 deszaturáz indukálódik igen rövid idő alatt (Tiku et al., 1996). Ez az enzim alakítja a sztearinsavat (18:0) olajsavvá (18:1 ω 9), és vonzónak látszik feltételezni, hogy ez az olajsav épül be a foszfatidiletanolamin sn-1 helyzetébe. Valóban Tiku és munkatársai kimértek egy jelentékeny növekedést a 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin szintjében.



10. ábra. In vitro hőmérséklet-shift hatása a neuronmembránok fluiditására. Az ábra a membránba illesztett DPH-PA fluoreszcens jelölt anizotrópia paraméterét mutatja



11. ábra. DPH-PA fluoreszcencia-anizotrópia paraméterének változása hal-vörösvérsejtekben in vivo hőmérséklet akklimatizáció során

Foszfolipidek molekuláris geometriája és a testhőmérséklet

Ezeknek az adaptív válaszoknak az értelmezésekor a különböző foszfolipidek geometriai viszonyait is figyelembe kell vennünk. Régebb óta ismeretes, hogy a foszfolipidek „alakja” eltérő, függően a fejcsoport és a zsírsavláncok térkitöltésétől.

Azok a foszfolipidek, amelyeknek fejcsoportja és zsírsavlánc kb. azonos térkitöltésű, hengeres alakúak, ilyen pl. a foszfatidilkolin, míg azok a foszfolipidek, amelyek fejcsoportja kisebb térkitöltésű, mint a zsírsavláncok térkitöltése, kónikus alakúak, ilyen pl. a foszfaidiletanolamin. A hengeres alakú foszfolipidek könnyen képeznek kettős rétegeket, nem így a kónikus alakú foszfolipidek, amelyek bizonyos és itt nem részletezett körülmények között ún. „nem kettősréteg-” (fordított hexagonális fázis, H_{II})-fázisba mennek át. Minden membrán tartalmaz bizonyos mennyiségű H_{II} -fázist képező komponenseket. Maga a membrán testhőmérsékleten nem megy át fordított hexagonális fázisba.

Kimutatták azonban, legalábbis mikroorganizmusoknál, hogy a testhőmérséklet és membránjaik „nem kettősréteg” tranzíciója közötti hőmérsékletkülönbség állandó, és ez nem több, mint kb. 15 °C (Morein et al., 1996). Nyilvánvaló, hogy gerincesekre hasonló törvényszerűség érvényes, de ilyen típusú méréseket még nem végeztek.

Azt is logikusnak látszik feltételezni, hogy a testhőmérséklet változásakor membránjaik „nem kettősréteg” tranzíciós hőmérséklete is változik. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a hidegadaptált halak membránjaiban miért magasabb a foszfatidiletanolamin szintje és fordítva (Thillard és de Bruin, 1981; Hazel és Carpenter, 1985).

Vannak irodalmi adatok, melyek azt mutatják, hogy a foszfatidiletanolamin szintjének illetően változása igen gyors (Hazel és Landrey, 1988). A 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin egy kónikus alakú molekula, és egyik szerepe éppen ez lehet a halakban.

Kimutattuk, hogy ennek a speciesnek szemben más foszfatidiletanolaminokkal a „nem kettősréteg” fázisátmenete feltűnően alacsony (Giorgione et al., 1995) (3. táblázat), így szintjében kis változás is jelentősen hozzájárulhat ennek az ún. „hőmérséleti ablak”-nak, ill. a membránok stabilitásának szabályozásához.

Az a tény, hogy a hidegvérűek a hőmérséklet csökkenése során kónikus alakú foszfolipideket igényelnek, már régóta ismeretes (Wieslander et al., 1980).

3. táblázat

Néhány foszfolipid hatása a 16:1/16:1 PE „nem kettősréteg” (hexagonális) fázisátmeneti hőmérsékletére (TH)

Hozzáadott foszfolipid	T _h változása (°C/adalék lipid mol frakciója)
18:0/22:6 PE	-84 ± 6
18:1/18:1 PE	-72 ± 19
18:1/22:6 PE	-143 ± 8
18:1/22:6 PC	+265 ± 8

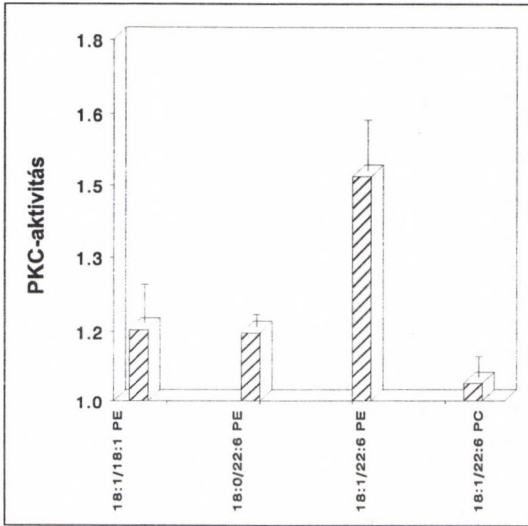
Más, „nem kettősréteg”-képző foszfolipidek az éterlipidek, ezek közül is az ún. plazmalogének, melyek egy vinyléter kötést tartalmaznak az sn-1 helyzetben. Kimutatták, hogy az etanolamin plazmalogének „nem kettősréteg” fázisátmeneti hőmérséklete lényegesen alacsonyabb, mint a diacyl formáké (Lohner, 1966). Bizonyos membránfélések különösen gazdagok etanolamin plazmalogénekben, ilyen a központi idegrendszer vagy pl. a plazmamembránok. Ezen a komponensek arányának hőmérsékletfüggő változása hozzájárulhat a membránok fiziokémiai paramétereinek meghatározásához az adott hőmérsékleten. Ezzel a koncepcióval összefüggésben kimutattuk, hogy az alacsony hőmérsékleten fejlődő hallárvák plazmamembránjában valóban magasabb az etanolamin plazmalogének szintje (65,2% vs. 52,5%), továbbá azt, hogy halagyakban szintje gyorsan és olyan irányban változik, amilyen az aktuális hőmérséklet (4. táblázat). Ezek a lipidek szintjében bekövetkező változások nyilvánvalóan szerepet játszanak a membrán „nem kettősréteg” fázisátmeneti hajlandóságának meghatározásában.

4. táblázat

Foszfatidiletanolamin alosztályok mennyiségének változása extrém hőmérsékletekhez adaptált és hőmérsékleti stressznek alávetett (72 órás) hal agyában

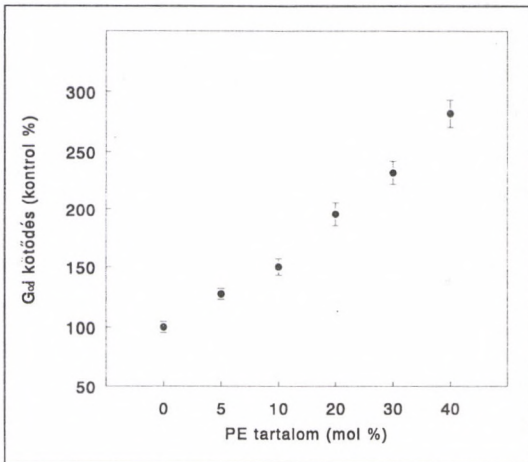
	22 °C	22/5 °C	22/5/22 °C	5 °C	5/22 °C	5/22/5 °C
Diacyl	63,7	20,0	42,0	20,0	60,5	33,0
Alkylacyl	3,5	9,2	4,6	3,1	3,2	29,0
Alkenylacyl	32,8	70,8	53,6	76,9	36,2	43,0

Annak ellenére, hogy ez a fázisátmenet testhőmérsékleten nem következik be, számos reakció (Ca⁺⁺ATP-ase, foszfolipáz A₂, PKC-aktivitás, szolubilis G-proteinek kötődése membránokhoz stb.) igényeli ezen lipidek jelenlétét (Kinnunen, 1996). A 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin PKC-aktivitásának szabályozásában játszott szerepét a 12. ábra mutatja.



12. ábra. Különböző foszfolipidek hatása a PKC-aktivitásra

membránokhoz kísérletes rendszerekben, minél szívesebben képez a hozzáadott foszfatidiletanolamin H_{II} fázist, másrészt minél nagyobb a koncentrációja (Escriba et al., 1997) (13. ábra).



13. ábra. Foszfatidiletanolamin (PE) hatása a Gal alegység liposzómához való kötődésére. A liposzómák tiszta foszfatidilkolint (0 mol% PE), majd növekvő, 5–40 mol%-ban PE-t tartalmaztak

Ismeretes, hogy ezen enzim aktivitásához „nem kettősréteg”-képező lipideket is igényel, ezt az igényt elsősorban digliceridek elégítik ki. Ha azonban a reakcióelegyhez 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin is adunk, az enzim aktivitása tovább növekszik (Giorgione et al., 1995). Arra nézve még nincsenek közvetlen megfigyeléseink, hogy ugyan-ez a foszfolipid elősegíti-e a szolubilis G-proteinek asszociációját membránokhoz, arra nézve viszont igen, hogy egyrészt egyfajta G-protein annál könnyebben asszociálódik

Így a 18:1/22:6 foszfatidiletanolamin a jelátvitelben, ill. annak testhőmérséklet-függő szabályozásában is lehet szerepe.

Külön figyelmet kell szentelnünk az etanolamin plazmalogének dinamikájára a halagyan. Mint említettük, ezek a molekulák kónikus alakúak, és mint ilyenek, igen könnyen vesznek részt sejtfúziós folyamatokban. Bizonyított tény, hogy a vezikulák közötti fúzió annál gyorsabb, minél telítelenebb etanolamin plazmalogének vesznek részt a folyamatban. Bizonyos vezikula-

összetétel mellett a fúzió sebessége megközelíti a szinaptikus vezikulák és a posztzinaptikus membránok között lejátszódó fúziót (Glaser és Gross, 1994). Bár nekünk közvetlen adataink nincsenek, vonzónak látszik feltételezni, hogy a halak agyában a hidegstressz során megnövekedett etanolamin plazmalogén-szint az alacsony hőmérséklet neurális transzmisszióra gyakorolt hatását lehet hivatva ellensúlyozni. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy az 1-monoen, 2-polyen foszfatidiletanolamin, valamint az etanolamin plazmalogének valamiféle hőmérsékleti stressz-elhárító szerepet játszanak a membránokban, és legfontosabb funkciójuk e szerkezetek strukturális és funkcionális integritásának biztosítása változó környezeti viszonyok között.

Összefoglalás

A membránalkotó foszfolipidek összetételének, a membránok fluiditásának a környezeti hőmérséklet változásainak során bekövetkező válaszok tanulmányozásakor megállapítottuk, hogy egyes hidegvérű szervezetekben bizonyos foszfolipid-molekulák kiemelt jelentőséggel bírnak. A membránok rendezettségének (fluiditásának) szabályozására a hőmérsékleti adaptáció során azok a specicsenek a legalkalmasabbak, amelyek az sn-1 helyzetben egy monoen, az sn-2 helyzetben egy polyen (elsősorban dokozahexaénsav) zsírsavat tartalmaznak. Az sn-1 helyzetbe beépített monoen zsírsav azon túlmenően, hogy minden más speciesszel ellentétben nemcsak növeli a membránok fluiditását és csökkenti a liquidkristályos merevgél-fázisátmenetet a testhőmérséklet csökkenésével párhuzamosan, hanem a foszfatidiletanolamin és az etanolamin plazmalogének esetében szabályozza az ún. „kettősréteg”- „nem kettősréteg”-fázisátmenet hőmérsékletét is, és ezzel hozzájárul a membránok funkcionális integritásának biztosításához változó hőmérsékleti viszonyok között.

Irodalom

- Applegate, K. R., Glomset, K. R.: Effect of acyl chain unsaturation on the conformation of model diacylglycerols: a computer modeling study. *J. Lipid Res.*, 1991. 32, 1635–1644.
- Behan-Martin, M. K., Jones, G. R., Bowler, K., Cossins, A. R.: A near perfect temperature adaptation of bilayer order in vertebrate brain membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993. 1151, 216–222.
- Bourre, J. M., François, M., Youyou, A., Dumon, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G.: The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.*, 1989. 119, 1880–1892.

- Buda, Cs., Dey, I., Balogh, N., Horváth, L.I., Maderspach, K., Juhász, M., Yeo, Y. K.: Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994. 91, 8234–8238.
- Coolebar, K. P., Beroe, C. B. Keough, K. M. W.: Gel to liquid-crystalline phase transitions of aqueous dispersions of polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines. *Biochemistry*, 1983. 22, 1466–1473.
- Dey, I., Buda, Cs., Wiik, T., Halver, J. E., Farkas, T.: Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993. 90, 7498–7502.
- Evans, R. W., Williams, M., Tinoco, J.: Surface areas of 1-palmitoyl phosphatidylcholines and their interactions with cholesterol. *Biochem. J.*, 1987. 245, 455–467.
- Farkas, T., Herodek, S.: The effect of environmental temperature on the fatty acid composition of crustacean plankton. *J. Lipid Res.*, 1964. 5, 369–373.
- Farkas, T., Csengeri, I.: Biosynthesis of fatty acids by the carp, *Cyprinus capio L* in relation to environmental temperature. *Lipids*, 1976. 11, 401–407.
- Farkas, T., Dey, I., Buda, Cs., Halver, J. E.: Role of phospholipid molecular species in maintaining lipid membrane structure in response to temperature. *Biophys. Chem.*, 1994. 50, 147–155.
- Fodor E., Jones, R. H., 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*, 1995. 30, 1119–1126.
- Gawrisch, K., Holte, L. L.: NMR investigations of non-lamellar phase promoters in the lamellar phase state. *Biophys. Chem.*, 1996. 81, 105–116.
- Glaser, P. E., Ross, R. W.: Plasmalyse ethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an H_{II} phase with its ability to promote membrane fusion. *Biochemistry*, 1994. 33, 5805–5812.
- Hazel, J. R., Carpenter, R.: Rapid changes in the phospholipid composition of gill membranes during thermal acclimation of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. comp. Physiol. B.*, 1985. 155, 597–602.
- Hazel, J. R. Prosser, C. L.: Molecular mechanism of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.*, 1974. 54, 620–627.
- Hazel, J. R., Landrey, A. S.: Time course of thermal adaptation in plasma membranes of trout kidney. I. Headgroup composition. *Am. J. Physiol.*, 1988. 255, R622–R627.
- Holman, R. T., Johnson, S. B., Ogburn, P. L.: Deficiency of essential fatty acids and membrane fluidity during pregnancy and lactation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991. 88, 4835–4839.
- Kemp, P., Smith, M. W.: Effect of temperature acclimatization on the fatty acid composition of goldfish intestinal lipids. *Biochem. J.*, 1970. 117, 9–15.
- Knippprath, W. G., Mead, J. F.: Influence of temperature on the fatty acid pattern of mosquitofish (*G. affinis*) and guppies (*L. reticulatis*). *Lipids*, 1, 1966. 113–117.
- Lohner, K.: Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structures manifested in the properties of biomembranes? *Chem. Phys. Lipids*, 1996. 81, 167–184.
- Michaelson, D. M., Horwitz, A. M., Klein, M. P.: Head group modulation of membrane fluidity in sonicated phospholipid dispersions. *Biochemistry*, 1974. 13, 2605–2612.

Membránfoszfolipidek molekuláris összetétele és a testhőmérséklet

- Morein, S., Golini, E. S., Rilfos, L., Lindblom, G.: Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a „window” between gel and non-lamellar structures. *J. Biol. Chem.*, 1986. 271, 6801–6809.
- Pagliarani, A., Pirini, M., Trigari, G., Ventrella, V.: Effect of diets containing different oils on brain fatty acid composition in sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) *Comp. Biochem. Physiol.*, 1986. 83B, 277–282.
- Precht, H., Christophersen, J., Hensel, J., Larcher, W.: *Temperature and Life*. Springer Verlag, New York, 1973. 330 p.
- Roy, R., Fodor, E., Kitajka, K., Farkas, T.: Fatty acid composition food only slightly affects physicochemical properties of liver total phospholipids and plasma membranes in cold adapted fresh water fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 1998. In press.
- Sinensky, H.: Adaptation a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1974. 71, 522–525.
- Singer, S. J., Nicholson, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972. 175, 720–731.
- Thillaard, G., van den Bruin, G.: Influence of environmental temperature on mitochondrial membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1981. 640, 439–447.
- Tocher, D. R., Sargent, J. R.: Direct effects of temperature on phospholipid and polyunsaturated fatty acid metabolism in isolated brain cells from rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992. 101B, 353–359.
- Wieslander, A., Christiansen, A., Rilfors, Lindbrom, H.: Lipid bilayer stability in membranes. Regulation of lipid composition in *Acheloplasma laidlawii* as governed by molecular shape. *Biochemistry*, 1980. 19, 3650–3655.
- Zabelinskii, S. A., Brovtsyna, N. B., Cheboterova, M. A., Gorbunova, O. B., Krivchenko, A. I.: Comparative investigation of lipids and fatty acid composition of fish gills and mammalian lungs. A model of the membrane lipid component areas. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1995. 111b 127–140.
- Yamamoto, N., Okaniwa, Y., Mori, S., Nomura, M., Okuyama, H.: Effects of a high-linoleate and high- α -linolenate diet on learning ability of aged rats. *J. Gerontol.*, 1991. 46, B17–B22.
- Yehuda, S., Rabinowitz, S., Mostofsky, D.: Modulation of learning and neuronal membrane composition in the rat by essential fatty acid preparation: time-course analysis. *Neurochem. Res.*, 1998. 23, 627–634.