

FOSZFOLIPID KÖRNYEZET SZEREPE AZ ADENIL-CIKLÁZ
AKTIVITÁSÁBAN

Doktori dolgozat

Nemecz György
MTA SZBK Biokémiai Intézete
1980.

T A R T A L O M

	Oldal
I. Bevezetés	1
II. Irodalmi áttekintés	
Az adenil-cikláz felépítése, működése és szerepe a sejt működésében	3
Membránok szerkezete és az adenil-cikláz membrán kapcsolatára	5
Adenil-cikláz enzim aktivitásának változása különböző körülmények között	6
Foszfolipáz C enzimmel való membránmódosítás, foszfolipidek szerepe	10
A foszfolipidek NMR spektroszkópiás vizsgálata	11
III. Célkitűzés	13
IV. Felhasznált anyagok és módszerek	
Patkány máj plazmamembrán kinyerése	15
Fehérje mérés	16
Zsirsavösszetétel meghatározása	17
Adenil-cikláz enzim aktivitásának vizsgálata	18
A cAMP elválasztása	19
Foszfolipidek elválasztása	19
Anorganikus foszfor meghatározása roncsolásos módszerrel	21
Foszfolipáz C kezelés	21
Foszfolipid beépítése plazmamembránba	22
Foszfatidiletanolamin-metiltranszferáz aktivitásának nyomonkövetése	22
NMR spektroszkópia alkalmazása a lipidek mozgékonyágának vizsgálatában	23
Nehéz-vizes liposzóma szuszpenzió készítése	24
Felhasznált anyagok	25



Kísérleti eredmények és értékelésük	26
Az enzimaktivitás függése a fehérje mennyiségétől	28
Reakciósebesség változása az idővel	29
Membrán módosítás foszfolipáz C segítségével	30
Az enzimaktivitás hőmérséklet-függésének nyomonkövetése	38
Foszfatidiletanolamin-metiltranszferáz EC. /2.1.1.17/ szerepe a plazmamembránban	45
NMR felvételek értékelése	47
Következtetések	53
Irodalom	59

ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK

- ATP : adenzin-5'-trifoszfát
cAMP : ciklikus adenzin monofoszfát
PS : foszfátidilszerin
PI : foszfátidilinozit
PC : foszfátidilkolin
PE : foszfátidiletanolamin
PG : foszfátidilglicerol
PA : foszfátidsav
SM : szfingomiellin
Tris : Tris-/hidroximetil/-aminometán
 P_i : anorganikus foszfor
Pl : foszfolipidek

Zsirsavak jelölése: az első szám a szén atomok
számát : a kettőspont utáni
a telítetlen kötések számát
jelenti

B E V E Z E T É S

Az élő szervezetben lejátszódó biokémiai folyamatok jelentős része biológiai határhártyákhoz kötött. Ezek a határhártyák, ismertebb nevükön membránok, elhatárolják és összekapcsolják ezeket a folyamatokat. Az *in vivo* és *in vitro* folyamatokról szerzett ismeretek ráirányították a figyelmet a sejtmembránok vizsgálatára, a membránon keresztül történő anyagtranszport mechanizmusának felderítésére és a membránokhoz kötött enzimek szerepének tisztázására. Fontos probléma ez a gyógyszerkutatás szempontjából is, mivel a gyógyszerek egy része nem jut be a sejt belsejébe, hanem a sejtmembránokon ill. az ott elhelyezkedő un. receptorokon keresztül fejti ki hatását. Az adenil-cikláz enzim működését Rall és Sutherland 1957-ben /1/ májszöveteken végzett kísérletsorozata folyamán fedezte fel. Egy hőstabil faktort izoláltak, ha a vizsgált szövetekhez glukagont vagy noradrenalinot adtak. Megállapították, hogy az ismeretlen vegyület adenint : ribózt : foszfátot tartalmaz 1:1:1 arányban. Fizikai és kémiai módszerekkel megállapították a vegyület szerkezetét, amely a ciklikus adenzin-3'5'-monofoszfátnak adódott. Ezt a vegyületet egy évvel korábban két amerikai kutatónak, Cooknak és Lipkinnek sikerült előállítani, amikor adenzintrifoszfátot

Ba/OH/2-dal melegítettek /2/.

Az adenil-cikláz vizsgálata során kiderült, hogy az enzim membránhoz kötött, és ebben az állapotában fejti ki hatását /3/. Azt is megállapították, hogy az enzim aktivitásában fontos szerepet játszanak a savanyu foszfolipidek /PS, PI/.

Valószínű azonban, hogy más foszfolipidek és egyéb membránalkotók is hatással vannak az enzim aktivitására. A membrán foszfolipidek döntő többségét a PC alkotja, és nyilvánvaló, hogy ez a foszfolipid meghatározó szerepet játszik ezen strukturák fizikai-kémiai sajátosságainak meghatározásában. Az enzim membrán kapcsolt működéséből adódik még az is, hogy bármilyen változás, amely a membránban morfológiai változást idéz elő, hatással lehet az enzim működésére.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az adenil-cikláz /E.C. 4.6.1.1/ felépítése, működése és szerepe a sejt működésében

Az adenil-cikláz felépítésére többen próbáltak következtetni. Az első modellt, amelyet Robinson, Butcher és Sutherland /4/ állított fel 1967-ben, két egységből; egy receptorból és egy katalitikus alegységből állt. A hormon kötődik a receptorhoz, ezáltal allostérikusan aktiválódik az enzim, növekszik a katalitikus alegység aktivitása, és az intracelluláris ATP-ből cAMP keletkezik. Ezt a modellt fejlesztette tovább Birnbauer, Pohl, Kraus és Rodbell 1970-ben /4/. Az általuk leírt rendszer a receptoron és a katalitikus alegységen kívül egy összekötő elemet, ún. transzdukáló faktort tartalmaz. Bár a két egység - a receptor és a katalitikus alegység - egymástól elválasztott, az összekötő dinamikus lipid matrix biztosítja az egymáshoz köztartást. Érdekes és új elképzelés a "mobil receptor" hipotézis Jacobstól és Cuatrecasastól /5/. A receptor csak azután kapcsolódik a katalitikus alegységhez, miután a hormon már rákötődött. Az összekapcsolódás mechanizmusa még nem tisztázott, azonban az biztos, hogy a foszfolipideknek és a guanil-

nukleotidoknak fontos szerepük van.

Már a vizsgálatok kezdetekor észrevették, hogy az enzim működéséhez Mg^{2+} -ionokat igényel /6,7/. Speciális esetben azonban más kétvegyértékű fémion / Mn^{2+} / helyettesítheti /8/.

A Sutherland által "második messenger"-nek nevezett cAMP a sejt különböző folyamatait befolyásolja. Hatásának helye pontosan nem ismert, befolyásolja a membrán permeabilitását, ezáltal a transzport folyamatokat. Szerepet játszik katabolikus enzimek szintézisében is, mivel az intracelluláris cAMP-szint befolyásolja a mRNS-iniciálását /9/. Fontos szerepe lehet minden olyan esetben, amikor nem szintetikus folyamat következik be a hormon hatására, hanem pl. mozgás, fagocitózis vagy éppen a sejt osztódása. Ez utóbbi esetben kimutatták, hogy a cAMP aktiválni képes a sejtosztódást, ill. a sejtosztódást serkentő hormon, a cAMP mechanizmuson keresztül hat /10/.

A cAMP aktiválhat enzimrendszereket pl. a glikogénanyagcsere szabályozásában, az ilyen módon aktiválódott protein-kináz ezenkívül más folyamatokban is szerepet játszik, ezzel kiszélesítve azt a hatáskört, amely a cAMP-nek tulajdonítható /11/.

Membránok szerkezete és az adenil-cikláz membrán kapcsolata

A membránok szerkezete már régóta foglalkoztatja a kutatókat. A kettős réteg szerkezet elképzelés Daniellitől és Davsontól /12/ származik, melyet Singer és Nicolson fejlesztett tovább a fluid mozaik modellé /13/. A felépített modellek abban egyeznek meg, hogy a membránok vázát foszfolipidek alkotják, melyek úgy rendeződnek, hogy a molekulák poláros, azaz hidrofil részei kifelé, ill. a citoplazmatikus tér felé, míg a hidrofób részei egymás felé tekintenek. A membránokban a foszfolipidek közé koleszterin, különböző gliceridek és más lipidféleségek ékelődnek. A foszfolipidek vizes közegben való ilyen elrendeződésének termodinamikai oka van. A membránok mindkét felszínéhez fehérjék kapcsolódnak, ezek néha belemélyedhetnek ezekbe a strukturákba, ill. át is hatolhatnak rajtuk.

A foszfolipidek membránokon belüli elrendeződésére nézve az az általános tapasztalat, hogy a savanyu foszfolipidek akár természetes, akár mesterséges membránokban a görbület belseje felé orientálódnak, míg a neutrálisak a külső felszínen koncentráálódnak /14, 15, 16/.

A membránokhoz számos enzim asszociálódik és normális működéshez foszfolipidekre van szükség. Ilyenek pl. a Na^+K^+ /ATP-áz /17/, a hidroxivajsavdehidrogenáz /18/, a mitokondriális elektrontranszport-rendszer /19/. Ezek között az enzimek között kétségtelenül különleges helyet foglal el az adenilcikláz-cAMP rendszer. Számos esetben ez tart fenn kapcsolatot a sejt és környezete között oly módon, hogy a környezet hormonok formájában továbbított ingereinek hatására fokozza a cAMP képzést, amely szükséges a megfelelő fiziológiai válasz kiváltásához. Ez a rendszer jelenlegi ismereteink szerint vertikálisan áttöri a membránt úgy, hogy a hormonreceptor alegysége annak külső felületén, míg a katalitikus alegysége a citoplazmatikus felszínhez asszociálódik /4/.

Adenil-cikláz enzim aktivitásának változása különböző körülmények között

Hőmérséklet-függés

Mivel az enzim membránhoz kötött és a lipid környezet befolyással van az enzim aktivitására, kézenfekvőnek látszik, hogy összefüggést keressünk a lipidek fázisváltási hőmérséklete és az enzim

aktivitása között. Megfelelő képet kapunk erről, ha az enzim specifikus aktivitását az Arrhenius összefüggésnek megfelelően ábrázoljuk, az egyenesben található törés a lipidek fázisváltozási hőmérsékletével magyarázható. Valószínű, hogy a lipidek töréspont alatt kristályos gél, míg a töréspont fölött folyékony kristályos állapotban vannak. A különböző szervekből nyert preparátumokon - mind a durva homogenizátumokon, mind a tisztított plazmamembránokon - végzett alapaktivitás mérések során fellelhetők ezek a töréspontok, azonban ezek különböző hőmérsékleteken találhatóak /20, 21, 22, 23/.

pH-függés

Az enzimreakciók többsége általában érzékeny a pH változására. Az adenil-cikláz vizsgálatakor is figyelmet fordítottak erre a tényre. Drummond és Duncan szivizomszövet esetén úgy találta, hogy pH 7,0-8,5 között nincs lényeges változás az enzim aktivitásában /6/. Ray, Tomasi és Marinetti patkány máj plazmamembrán esetében pH 8,0-nál talált maximumot, azonban pH 7,5-8,5 között nincs lényeges aktivitásváltozás /6/. Általában a kutatók többsége pH 7,5-ös Tris-HCl puffert használ, vigyázva arra, hogy az inkubációs elegy pH-ja 7,5-8,0 között maradjon.



Az enzimaktivitás függése a fehérje mennyiségétől

A mérések során figyelembe kell venni a membrán fehérje mennyiségét is, mivel az enzim aktivitása és a membrán fehérje koncentrációja között a linearitás az esetek többségében szűk tartományban érvényesül. Marinetti és mts-i egy maximum jellegű görbét kaptak az enzim aktivitása és a membrán fehérjetartalma között, patkány máj plazmamembrán esetén /23/. Rodbell és mts-i zsirsejtek vizsgálatakor telítési görbét kaptak /8/. A lineáristól való eltérés oka az, hogy egy bizonyos membránfehérje koncentráció esetén a reakcióidő alatt elfogy az ATP, valamint felerősödnek olyan biokémiai folyamatok, amelyek gátolják az adenil-cikláz működését, amit az inkubációs elegy összeállításakor figyelembe vettünk. Célszerű meggyőződni arról a mérések során, hogy milyen fehérje koncentráció mondható ideálisnak a kísérlet során, ill. melyik az a koncentráció-tartomány, ahol a különböző mérések eredményei jól összeegyeztethetők.

Hormonok és különféle vegyületek hatása az adenil-ciklázra

A legtöbb ismeretanyag talán ezen a területen halmozódott föl az adenil-cikláz kutatásában.

Ezért csak olyan dolgozatokat említek meg ebben a fejezetben, amelyek szorosan kapcsolódnak a diszszertációhoz.

Rublacava és Pliégo cseppfolyós nitrogénben tárolt patkány máj plazmamembránt vizsgáltak, és az alapaktivitás Arrhenius féle ábrázolásában 20°C -on találtak törést /20/. Houslay és mts-i 10^{-6} M glukagont adtak az inkubációs elegyhez és $28,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ -on kaptak törést /19/. Ha benzilalkoholt is adagoltak különböző koncentrációkban, a töréspont alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódott el /24/. Katekolaminok a töréspont helyét nem változtatják számottevően /21, 25/. Az egyes hormonok aktiváló hatása igen különböző. Természetesen ez függ a preparátum minőségétől, az állatok korától, nemétől, valamint attól, hogy milyen szövetből dolgoznak.

Igen jó stimuláló hatást fejt ki a glukagon a májban, az alapaktivitás huszszorosát, sőt ennél többet is elérhet /26, 19/. Hasonló, vagy valamivel kisebb hatást értek el guanilil-imidotrifoszfáttal és izoproterenollal /27/. A noradrenalin kisebb mértékben aktivál, természetesen itt az L-módosulatot kell érteni, mivel a katekolaminoknál a sztereospecifitás is jelentkezik, a D-módosulat kevésbé hatásos, a racém hatása ennek megfelelően átlagolódik /26, 28/.

Igen gyakran alkalmaznak aktivátorként fluorid iont, azonban a fluorid hatása eltér az előbb említett hormonokétól /19/. Ezenkívül igen sok vegyületet próbáltak ki, amelyek befolyásolták az enzim aktivitását.

Foszfolipáz C enzimmel való membránmódosítás, foszfolipidek szerepe

A foszfolipideket bontó foszfolipáz C enzim a foszforsavészter kötés mentén hasít, a hidrolizis eredményeképp diglicerid és egy foszforsavészter keletkezik. A különböző baktérium törzsekből izolált foszfolipáz C izoenzimek specifikusak az egyes foszfolipidekre /29, 30/. Így lehetséges szelektív hidrolizis révén a membránokból különböző foszfolipideket eltávolítani.

Levey kísérletei macska szívizom adenil-cikláz esetén azt mutatták, hogy a foszfolipid-hiányos szolubilizált enzim aktivitása foszfatidilszerin adagolására visszaállt, ha a rendszert glukagonnal stimulálták /31/. Hasonló eredményre jutottak Réthy és mts-i, amikor foszfolipáz C kezelt mintákhoz foszfatidilszerint adtak, visszaállt a hormonaktiválhatóság. A foszfatidilinozit az alapaktivitást állí-

totta helyre /32, 33/.

Itt kell megjegyezni azt, hogy a foszfolipáz C kezelésnél az emésztési idő és az enzim koncentráció fontos szerepet játszik a membrán módosításban.

Előfordulhat, hogy hosszabb emésztés hatására a teljes szerkezet felbomlásával kell számolni, míg egy rövid ideig tartó enyhe behatás csak szelektív változást okoz. A különböző eredmények összehasonlításánál erre figyelmet kell fordítani. Kísérleteket végeztek - a plazmamembránok fluiditásának és a foszfolipid környezet megváltoztatásával - módosított preparátumok enzimaktivitásának meghatározására.

Dimirisztoil-foszfatidilkolint adagolva eltolható volt az Arrhenius függvény töréspontja /19, 24/.

A foszfatidil-kolinok adagolása az enzimaktivitást is csökkentette /34/. In vivo kísérletekben etanolamint adva LM fibroblaszt sejtkulturákhoz - ezáltal megváltoztatva a foszfolipid összetételt - növelhető volt az adenil-cikláz aktivitása, a különböző telítetlen zsírsavak is hatással voltak az aktivitásra /35, 36/.

A foszfolipidek NMR spektroszkópiás vizsgálata

Az NMR spektroszkópiás vizsgálatok elvét, a jelzélesség-fázisállapot összefüggés magyarázatát a módszerek c. fejezetben ismertetem. Itt csak néhány

vizsgálati lehetőséget említék meg a teljesség igénye nélkül.

- a./ Relaxációs idő meghatározások: ^{13}C NMR esetében a H-NMR "átlagolt protonjele" helyett az egyes alkiláncmetilének ^{13}C jelei felhasadnak, vagyis a mozgási viszonyok vertikálisan térképezhetők /37, 38/.
- b./ Részlegesen deuterált rendszerek esetében olyan molekulaszegmensek mozgásviszonyai is vizsgálhatók / ^2H -NMR/, amelyekre tisztán protonált rendszerekben nincs lehetőség /39/.
- c./ Az un. ^{31}P -NMR vizsgálatok a foszfolipidek foszfát csoportjának mozgékonyására és átlagos orientációjára adnak felvilágosítást /40/.

CÉLKITÜZÉS

Munkánk célja a membránokhoz kötött adenil-cikláz enzim és a membránok felépítésében fontos szerepet játszó foszfolipidek közötti kapcsolat felderítése. Olyan vizsgálati rendszert kellett keresnünk, amely könnyen kezelhető, viszonylag egyszerű módon előállítható és a belőle nyert információk jól hasznosíthatók. Erre a célra a patkány májból izolált plazmamembránt választottuk.

Ismeretes, hogy más szövetekből készült membránok cikláz aktivitása nagyobb, pl. sziv, agy. Azonban ezek izolálása nehezebb és nagy mennyiségű kísérleti állatot igényel. Mivel célunk elsősorban az adenil-cikláz és környezete közötti kapcsolat felderítése és értelmezése volt, a patkány máj plazmamembrán mint vizsgálati rendszer jól megfelelt.

A membránfunkciók szempontjából meghatározó szerepük van a foszfolipideknek. Ezek elhelyezkedése és különböző arányuk, a fehérjékhez való kötődésük gátolhatják, vagy serkenthetik a membránon, vagy azon keresztül lejátszódó folyamatokat. Ezért célszerűnek látszik a vizsgálatokat olyan irányban folytatni, amely a foszfolipid összetétel megváltoztatására irányul. Munkánk során két különböző módon, foszfolipid adagolással és foszfolipáz C

emésztéssel változtattuk meg a foszfolipid komponensek arányát. Mindkét beavatkozás azt célozta, hogy az adott "rendet" megbolygassuk, és az így kialakult új helyzetekből próbáljunk meg következtetéseket levonni az enzim és a környezet kapcsolatára. Törekvéseink végső soron a közvetlen gyakorlati hasznosság lehetőségeihez is elvezethetnek. A katekolaminok hatásmechanizmusának felderítése új gyógyászati lehetőségek kidolgozását teszi lehetővé.

FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Patkány máj plazmamembrán kinyerése

Kísérleteinkhez laboratóriumi fehér patkány máját használtuk fel. A plazmamembrán elkülönítése a Neville-módszer /41/ módosításával történt. A szükséges mennyiség kb. 45 g, amely nyolc fiatal állat mája. A májat 1 mM-os NaHCO_3 -ban mossuk, feldaraboljuk és újra átmoszuk, majd Dounce homogenizátorral homogenizáljuk 100 ml 1 mM-os NaHCO_3 -ban. A kapott homogenizátumok felhígítjuk 500 ml-re és szűrjük gézrétegen keresztül. A műveletet 4°C -on végezzük. A szuszpenziót 15 percig centrifugáljuk 1500 x g-vel. A centrifugálás után az üledéket homogenizáljuk, az így kapott homogenizátum 50-60 ml. 68 ml 69 %-os szacharozt összekeverünk 52 ml homogenizátummal; a sűrűségnek 44 %-nak kell lenni. Gradienst készítünk: 20 ml 44 %-os szuszpenzióra 15 ml 42,3 %-os szacharozt rétegzünk a centrifugacsőben. Spinco SW 27 rotort használunk, és két órát 4°C -on 25000 rpm-el /közelítőleg 100 000 x g/ centrifugáljuk.

A gradiens felső rétegét eltávolítjuk és kétszer 8 ml 1 mM-os NaHCO_3 -tal felszuszpendáljuk és újból centrifugáljuk 15 percig 25 000 x g-vel. Az így kapott preparátumot úgy hígítjuk, hogy a fehérje kon-



centráció 2 mg/ml legyen. A preparátum cseppfolyós nitrogénben hosszabb ideig eltartható az enzim károsodása nélkül.

Fehérje mérés

A fehérje koncentrációjának meghatározását a Lowry módszer alapján végeztük /42/. 50 ml A oldathoz /2 % Na_2CO_3 0,1 N NaOH-ban oldva/ 1 ml B oldatot /1 % CuSO_4 + 2 % K-Na-tartarát 1:1 arányu elegye/ adunk, melyet frissen kell elkészíteni. Az így kapott C oldatból 3 ml-t veszünk, és annyi deszt. vizet adunk hozzá, hogy a mérendő fehérjeoldat térfogatával együtt 3,6 ml legyen.

Szükséges ismert töménységű fehérjeoldatból koncentráció sorozatot készítettünk, amelyet kalibrációs görbe megszerkesztéséhez használunk fel. Az elkészített oldatokat 10 percig állni hagyjuk, majd 0,3 ml Folin reagenst /MERCK/ adunk hozzá. Ezután ismét állni hagyjuk az oldatot 30 percig. Az így kezelt anyagnak spektrofotométeren megmérjük az oldat extinkcióját 750 nm-nél. A kapott értékeket visszakeressük a kalibrációs görbén.

Zsirsavösszetétel meghatározása

A Tris-HCl pufferben szuszpendált membránfrakciót kloroform : metanol 2:1 arányu elegyében extraháltuk. A fehérje és egyéb nem lipoid természetű anyagok csapadék formájában kiülepednek, ezt szűréssel eltávolítottuk.

A kloroform : metanol elegyhez 0,2 M KCl oldatot adtunk, a sóoldat hatására a rendszer két fázisra különül el, a lipidek az alsó kloroformos fázisban koncentrálnak. A felső fázis /viz-metanol/ eltávolítása után az oldatot vízmentes Na_2SO_4 -on engedjük keresztül, hogy a maradék víznyomokat is eltávolítsuk. A kloroformos lipid oldatot bepároltuk, majd 5 %-os HCl-metanol /kb. 5 ml/ adtunk hozzá és a kémcsövet leforrasztva 80°C -on inkubáltuk. A bombacsövet felbontva kb. 1 ml vizet és 2 ml petrolétert adtunk hozzá, a zsirsav metilészterek a petroléteres fázisba mennek át. A petroléteres fázist leszivtuk és bepároltuk, majd igen kis térfogat /kb. 5 μl / benzolban vettük fel a vizsgálandó mintát. A mintákat JEOL 1100-as lángionizációs detektorral működő gázkromatográf segítségével analizáltuk, az oszlop töltet megosztófázisa SP 2330 vagy 2340, a hordozófázis 100-200 Mesh szemcsenagyságu Chromosorb W AW volt.

Az egyes zsírsavészter csucskok azonosítása standardokkal történt, a csucskok alatti területet planimetriás módszerrel állapítottuk meg.

Adenil-cikláz enzim aktivitásának vizsgálata

Az adenil-cikláz enzim aktivitásának vizsgálatakor figyelembe vettük, hogy a membrán preparátum több olyan enzimet tartalmaz, amely befolyással van az általunk vizsgált reakcióra. A kísérletekhez ennek megfelelően választottuk meg a reakció körülményeket. A reakcióelegy a következő anyagokat tartalmazta: 5 mM $MgCl_2$ /az enzim Mg^{2+} -ionokat igényel működéséhez/, 1 mM aminofillin /a foszfodiészteráz működésének visszaszorítására/ 0,5-3 mM "nem jelzett" ATP, 10 mM kreatinfoszfát és 0,1 mg/ml kreatin-kináz /ATP regeneráló rendszer/, 0,1-2 mM "nem jelzett" cAMP /hogy ne a keletkező "jelzett" cAMP használódjék fel más irányu reakciókban/, annyi ^{32}P - α -"jelzett" ATP, hogy az aktivitás 1-1,5 $\mu Ci/100 \mu l$ legyen. Az elegy pH-ját 50 mM-os Tris-HCl /pH 7,5/ pufferrel állítottuk be. A reakciót a membránpreparátum, amely az adenil-cikláz enzimet tartalmazza, hozzáadásával indítottuk el. A hozzáadott 20 μl preparátum fehérje tartalma 40-80 μg között volt. Így a reakcióelegy végtérfogata 70 μl volt.

A reakciót 0,15 N HCl-val és két perc forralással állítottuk le. Az oldat semlegesítése 0,1 N imidazollal történt /44/.

A cAMP elválasztása

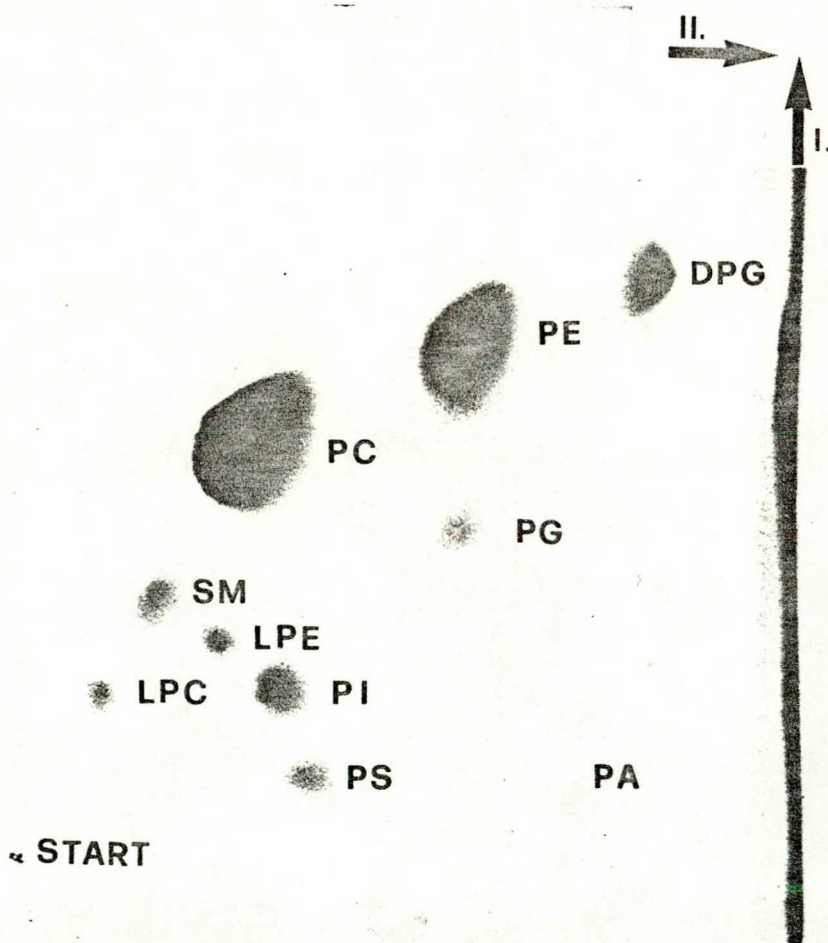
A jelzett cAMP elválasztása oszlopkromatográfiás módszerrel történt /43/. Az oszloptöltet Al_2O_3 /MERCK Brockman I/, az oszlop belső átmérője 1 cm, az 1 g oszloptöltet magassága közelítőleg 3 cm volt. Eluálószerként deszt. vizet alkalmaztunk. Az oszlopról elsőként a cAMP eluálódik, amely jól elválik a többi komponens-től.

Az 1,5 ml térfogatu mintákat 10 ml Bray-oldatban vettük fel és aktivitásukat Packard Tri-Carb Scintillation Spectrométer 3003 vagy LKB 8100-as készülékekben mértük.

Foszfolipidek elválasztása

Amint a zsírsavak elválasztásánál említettük, a membránkészítményt kloroform : metanol 2:1 elegyében extraháltuk. Szűrés és a metanol-viz eltávolítása után az elegyet bepároltuk, majd 50 μl kloroform:metanol 2:1 újra oldatba vittük a lipideket. A szétválasztást Silicagél H lapon végeztük két dimenzióban. A lapot 1,5 %-os Mg-acetát oldattal impregnáltuk, és

1 órán keresztül 115 °C-on aktiváltuk. Az első dimenzióban a szolvens kloroform : metanol : ammoniumhidroxid 65:25:5 arányu elegye volt. A lapot 90 °-kal elforgattuk, és a második dimenzióban kloroform : aceton : metanol : ecetsav : viz 30:40:10:10:5 arányu elegyét használtuk. Az egyes foszfolipidek azonosítása irodalmi adatok alapján történt /41/, ill. az általunk használt standardokkal. Az előhívást 2 %-os rodamin B vizes oldatával végeztük /44/. Abban az esetben, ha a foltokból csak P_i tartalmat akartunk meghatározni, akkor a lapokat jódgőzben hivatuk elő.



1. ábra: Foszfolipidek elválasztása

Anorganikus foszfor meghatározása roncsolásos módszerrel

A meghatározandó foltra 50 %-os H_2SO_4 -at csep-pentünk úgy, hogy a folt teljes egészében átitatódjék. A lapot $180\text{ }^\circ\text{C}$ -on 5 órán át szárítószekrényben tartottuk, a lekapart folthoz 4 ml deszt. vizet és 1 ml foszforreagenst adtunk. /6,85 g Na-molibdenát + 0,4 g hidrazin-szulfát + 100 ml cc. H_2SO_4 + 500 ml deszt. viz, hűtés után 1000 ml-re kiegészíteni./ A mintákat $100\text{ }^\circ\text{C}$ -on 30 percet forraljuk, spektrofotométeren 700 nm-nél mérjük az extinkciót. A standard 3,9 ml deszt. viz + $100\text{ }\mu\text{l } 10^{-3}\text{ M } KH_2PO_4$ + 1 ml foszforreagens /44/.

Foszfolipáz C /EC 3.1.4.3/ kezelés

A foszfolipáz C és a membrán fehérje legkedvezőbb arányának megfelelően a kísérletek többségében 10 mg fehérjéhez 1 mg foszfolipáz C-t használtunk, amelyet $100\text{ }\mu\text{l } 50\text{ mM}$ -os Tris-HCl pufferban /pH 7,5/ oldottunk fel, ehhez adtunk $50\text{ }\mu\text{l } 0,5\text{ mM}$ -os $CaCl_2$ -ot. A foszfolipáz C kezelést szobahőmérsékleten végeztük. 1 ml membrán készítményből indultunk ki és a megfelelő időben mintákat vettünk. A kivett aliquotokat tiszszere-sére higitottuk 25 mM -os Tris-HCl pufferrel /pH 7,5/,

amely 1 mM EDTA-t és 2 mM $MgCl_2$ -ot tartalmazott. Ezután a mintákat lecentrifugáltuk és az üledéket végül 50 mM-os Tris-HCl pufferban /pH 7,5/ felszuszpendáltuk /45/.

Foszfolipid beépítése plazmamembránba

Erre a célra a Serdary Research Laboratories foszfolipid preparátumát használtuk. A kloroformos oldatot nitrogén gázzal vékonyan a kémcső falára pároltuk, majd hozzáadtuk a membránpreparátumot és 5-10 percet - a beépítendő foszfolipid mennyiségétől függően - rázattuk. Ezután centrifugáltuk a szuszpenziót 5000 x g-vel és az üledéket újra szuszpendáltuk 50 mM-os Tris-HCl pufferben.

A módszer hatékonyságáról ismert mennyiségű dimirisztoil-foszfatidilkolin visszamérésével győződünk meg.

A foszfatidiletanolamin-metiltranszferáz /EC 2.1.1.17/ aktivitásának nyomonkövetése

A foszfatidiletanolaminnak foszfatidilkolinná történő átalakulását a metil csoportban 3H -mal jelzett S-adenozil-L-metionin metil csoportjának beépülésével követtük. Az inkubációs elegy S-adenozil-L-metionint /2-5 μCi /, 10 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA és 50 mM

Tris-HCl puffert /pH 7,5/ tartalmazott. A fehérje konc. 120-150 μ g volt az egyes mintákban, a reakciót 30 °C-on végeztük és különböző időpontokban mintákat vettünk. A reakciót kloroform : metanol 2:1 elegyével állítottuk le. A jelzett foszfatidilkolint vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel választottuk el /46/.

NMR spektroszkópia alkalmazása a lipidek mozgékony- ságának vizsgálatában

Az NMR spektroszkópiás mérésekre ebben az esetben az ad lehetőséget, hogy a jelszélesség és a fázis-állapot között összefüggés van. A módszer nagy előnye, hogy idegen anyag bevitele nélkül, minden perturbációtól mentesen teszi lehetővé a minták szerkezetének vizsgálatát. A mérések elve a következő:

Minden elemi részecske /elektronok, protonok stb./ elemi mágneseknek, dipólusoknak tekinthetők. Az elemi mágnesek egy mesterségesen létrehozott mágneses térben részben paralel állnak a mágneses tér irányára. Ez egyben diszkrét energianivóknak felel meg. A sugárzás abszorpciója a diszkrét energianivók közötti átmeneteket eredményezi. Az energianivókat a vizsgált anyagban előforduló atommagok mágneses tulajdonságai határozzák meg, az átmenetek során az atommagok mág-

neses momentumának a külső mágneses térhez viszonyított orientációja változik meg.

A relaxációs idők azt fejezik ki, hogy a gerjesztett magnak egy adott spinállapotban mekkora a tartózkodási élettartama. A relaxációs idők csökkenése újabb energia abszorpcióját és ezáltal a rezonancia-vonal kiszélesedését eredményezi. Az elv egyszerű tapasztalati bizonyítéka: ha egy protontartalmu rendszer fluiditása csökken, a jel kiszélesedik. Mivel egy proton tartalmu vegyület szerkezetére, molekuláris környezetére a rezonanciajelek helyéből következtetünk, meg kell említenünk az ún. másodlagos hatásokat. Ezeknek oka a molekulán belül keresendő. A mag körül levő elektronfelhő, továbbá a vegyületen belüli szomszédos magok speciális kölcsönhatása minden egyes csoportot és molekula részletet /mely protonokat tartalmaz/ felismerhetővé tesz. A rezonanciajel helye a vonaleltolódás, /jele: δ , egysége: ppm/.

Nehésvizes liposzóma szuszpenzió készítése

A patkány máj plazmamembrán foszfolipidjeinek liposzóma-suszpenzióit az alábbi módon készítettük: 10-15 mg-ot a foszfolipid kivonatból kloroform : metanol 2:1 elegyében felvettünk és vastagfalu centrifugacsőben vékony rétegben nitrogénnel a cső aljára párol-

tunk. A bepárolt filmre 1 ml nehézvizet öntöttünk. Egy 150 W-os MSE generátorral 10 percig ultrahangozva optikailag tiszta oldatot nyertünk. Ultrahangozás közben a mintákat jéggel hűtöttük. Felvételek készültek deuterált kloroformban felvett mintákkal is. A két felvételi mód jól összeegyeztethető volt. A felvételeket Sándor Péter, a Központi Kémiai Kutató munkatársa készítette.

Felhasznált anyagok

ATP-dinátriumsó, cAMP, Aminofilin /Teofilin₂ x Etiléndiamin/, kreatin-foszfát dinátriumsó-hidrát, kreatinkináz 30 Eu/mg, foszfolipáz C /lecitináz C, Clostridium welchii-ből izolált/ isoproterenol HCl, a Sigma /St. Louis, USA/ cég készítményei. A foszfolipid preparátum SRL készítménye.

³²P-5'trifoszfát nátriumsója /D.P.G. 16,4 Ci/mmol/ az Ammersham cég készítménye volt, a ³H S-adenozil-L-metionin /D.P.G. 8,2 Ci/mmol/ a New England Nuclear készítménye volt.

/SRL: Sardary Research Laboratories Canada/



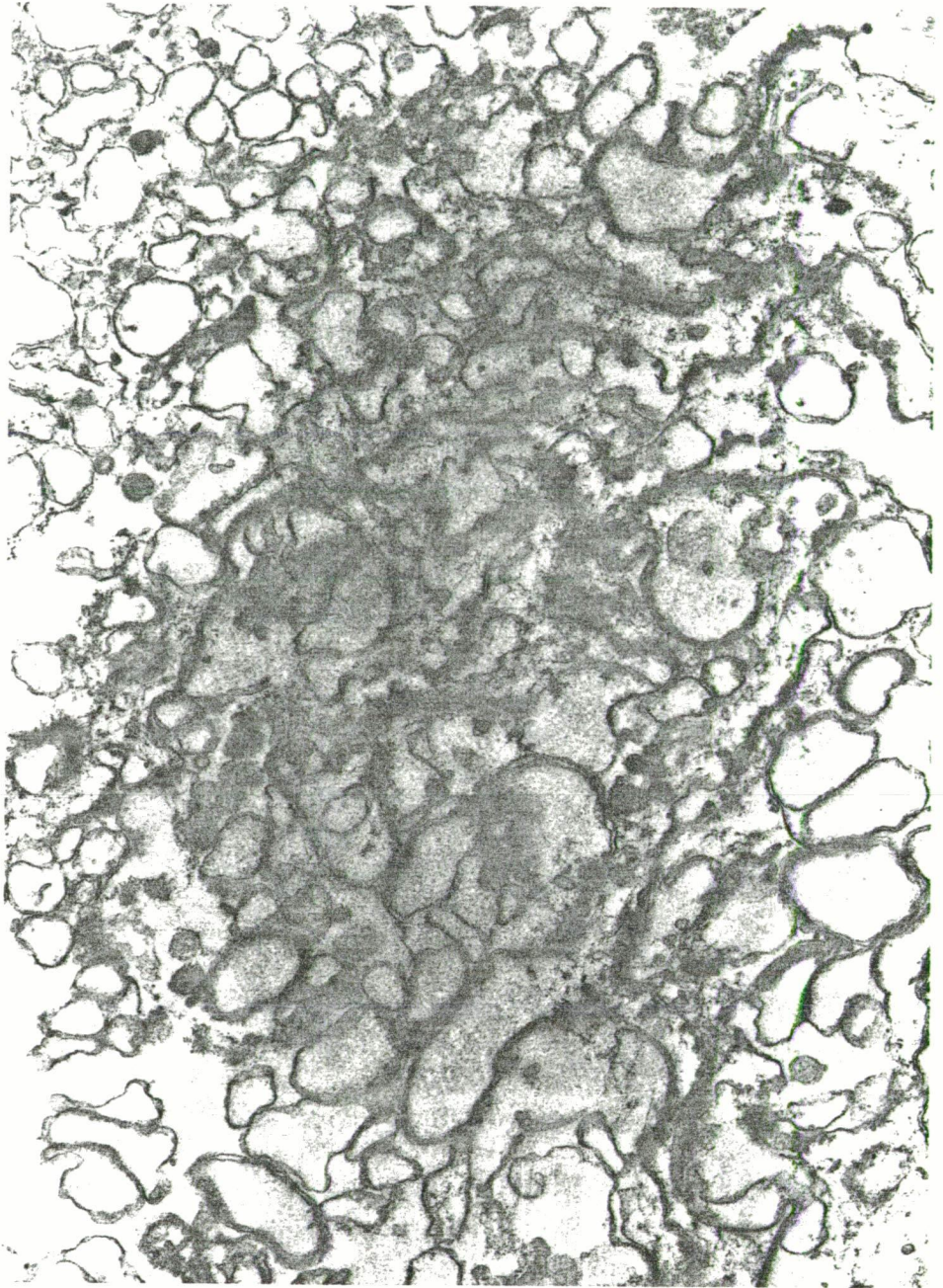
KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

Kísérleteinkhez laboratoriumi fehér patkány májából nyert plazmamembránt használtunk, melyet a Módszerek című fejezetben leírtak alapján állítottunk elő. A készítmény "tisztasága" megfelelt a mások által leírt preparátumokénak. A membrán készítményről elektronmikroszkópos felvételek is készültek, ezek közül mutatunk be egyet. /2. ábra/

A kísérleteinkhez felhasznált plazmamembránok cikláz aktivitása nem különbözött számottevően.

Első lépésként meghatároztuk a plazmamembrán fehérje tartalma és a cikláz aktivitása közötti összefüggést. Majd a foszfolipid és a zsírsav összetételt. A plazmamembránok két fő építőköve a fehérje és a foszfolipid, amelyek megfelelő szerkezet kialakulásával képezik a sejtek működéséhez nélkülözhetetlen határhártyákat.

A bimolekuláris foszfolipid réteg a hőmérséklettől függően változtatja fizikai-kémiai állapotát. Egy bizonyos hőfok alatt a foszfolipidek apoláris zsírsavláncai megmerevednek, a membrán kristályos gél állapotába kerül. E hőmérsékleti pont felett a zsírsavlánccok mobilisak, a membrán folyékony kristályos állapotba megy át. Azt a hőmérsékletet, ahol ez a változás bekövetkezik, fázisváltozási hőmérsékletnek, "transition temperature"-nek nevezik.



2. ábra: Patkány máj plazmamembrán elektromikroszkópos képe /6700 x nagyítás/

E rendszerek fázisváltóási hőmérsékletét elsősorban a lipidekben előforduló zsírsavak szénatomszáma

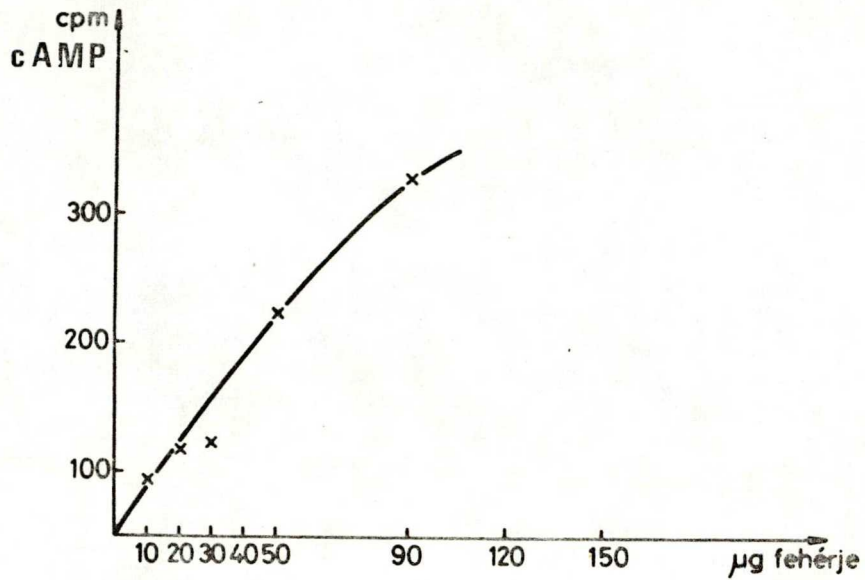
és telítetlensége határozza meg. A töréspont alatt kisebb az enzim aktivitása és nagyobb aktiválási energiát igényel, e fölött viszont fordított a helyzet.

Az enzim-aktivitás függése a fehérje mennyiségétől

Ahhoz, hogy megfelelő aktivitás értékeket kapjunk, valamint más biokémiai folyamatok ne éreztessék hatásukat, célszerű megvizsgálni az enzim aktivitás függését a fehérje koncentrációtól.

Egy bizonyos fehérje koncentráció fölött a lineáristól eltérő összefüggés áll elő, gyakori, hogy aktivitás csökkenés tapasztalható. Ez több okra vezethető vissza, így pl. a vizsgálati rendszer ATP tartalma gyorsabban csökken, így a szubsztrát felesleg megszűnik a reakció időtartama alatt, az ATP bontásban részt vesz a nukleotid-pirofoszfátáz, és ezt a hiányt az alkalmazott ATP regeneráló rendszer nem tudja pótolni. Erősödik a 3'5' cAMP foszfodiészteráz hatása is, melyet nem lehet teljesen gátolni és még több ismert és kevésbé felderített folyamat játszódik le, amely nehezíti az adenil-cikláz vizsgálatát. Ezért célszerű olyan membrán fehérje koncentrációval dolgozni, amely az adenil-cikláz aktivitásának mérése szempontjából optimális. Kísérleteink során a reakcióelegy fehérje tartalma 40-80 μg

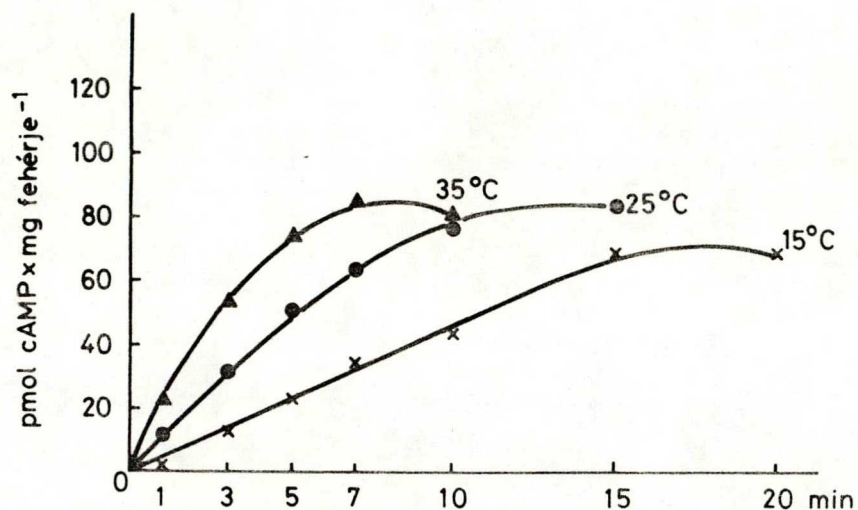
között ingadozott.



3. ábra: A keletkezett cAMP^{32}P és a membrán fehérje koncentráció közötti kapcsolat

A reakciósebesség változása az idővel

Figyelembe kell még venni azt is, hogy a reakciósebesség időben nem állandó, és olyan reakcióidő tartományban kell dolgozni, ahol a reakciótermék időegységre eső változása lineáris. Alacsony hőmérsékleteken ez a linearitás viszonylag hosszú időintervallumban érvényes. A hőmérséklet emelkedésével ez a szakasz egyre csökken, amint ez a 4. ábrából is kiderül.



4. ábra: Patkány máj plazmamembrán adenil-cikláz aktivitásának időfüggése különböző hőmérsékleteken

Vizsgálataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy szobahőmérsékleten tíz percnél tovább nem érdemes enzimaktivitást mérni. A kinetikai méréseknél három perces reakcióidő intervallummal dolgoztunk, mivel 0-3 perc között minden esetben lineáris volt az időegységre eső cAMP keletkezése.

Membrán módosítás foszfolipáz C segítségével

Ahhoz, hogy az enzim és környezete közötti kapcsolatot vizsgálni tudjunk, valamilyen változást kell

előidézni vagy az enzimben, vagy annak környezetében. Mi ez utóbbi megoldást választottuk. Lecitináz C segítségével elhidrolizáltuk a PC tartalom jelentős részét. Bár ez a foszfolipid képviseli a foszfolipid kettősréteg jelentős részét, eddig a kutatók nem tulajdonítottak neki jelentős szerepet az enzim működésében, ugyanigy a PE-nak sem. Ez utóbbi foszfolipid szintén magas százalékos arányban fordul elő a plazmamembránban /47, 48/.

I. Táblázat

Patkány máj plazmamembrán foszfolipid összetétele

Foszfolipidek	%-os összetétel Ray, Skipski alapján	Általunk mért
PC	34,9	30,5
PE	18,5	23,5
PI	7,3	9,2
PS	9,0	10,0
PG	4,8	2,5
LPC	3,3	3,0
LPE	-	1,5
DPG	-	5,0
SM	17,7	14,5
PA	-	>1

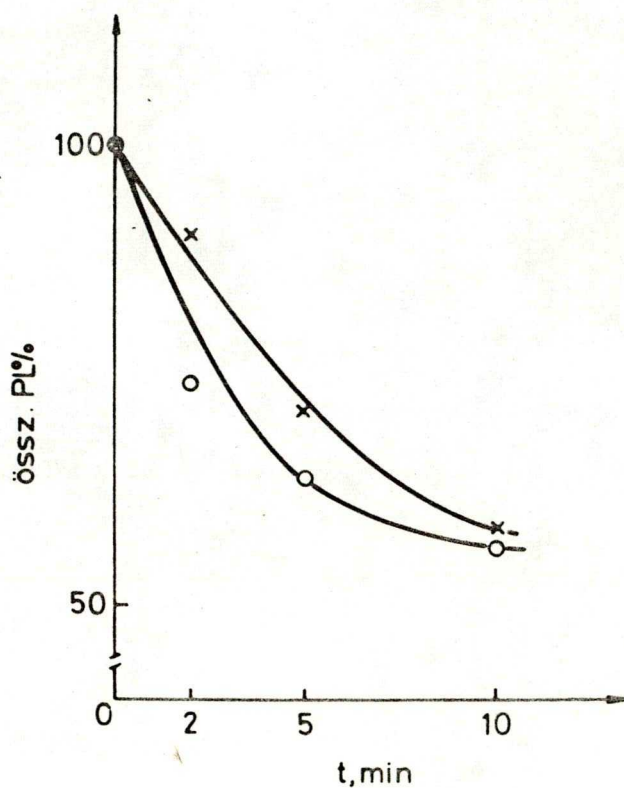
Egyes szerzők a savanyu foszfolipidek szerepét hangsúlyozzák /PI, PS/, mind az alapaktivitásban, mind a hormonaktiválhatóságban /32, 33/.

Nem tűnik azonban elképzelhetetlennek, hogy a többséget képviselő foszfolipidek /PE, PC/ ha másként nem is, a membránstrukturák fizikai-kémiai állapotának meghatározásában játszanak szerepet és ezáltal közvetve hatnak az adenil-cikláz enzimre is.

10 perces foszfolipáz C kezelést alkalmazva az összes foszfolipid mintegy 40 %-a elhidrolizált, a kezelési idő növekedtével számottevő csökkenés már nem tapasztalható. Az 5. ábrán az össz foszfor tartalom változását követhetjük nyomon két különböző foszfolipáz C koncentrációt alkalmazva.

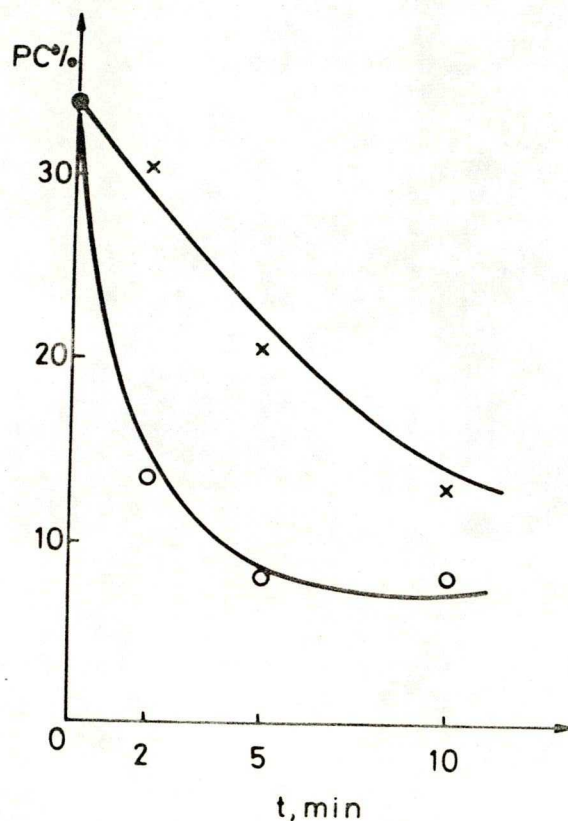
A későbbiek során az 1:10 foszfolipáz C : fehérje arányt alkalmaztuk, mivel ez bizonyult optimálisnak az enzimaktivitás változásának nyomonkövetésére. Viszonylag rövid idő alatt idézett elő megfelelő változást és még jól mérhető volt az enzim aktivitása is.





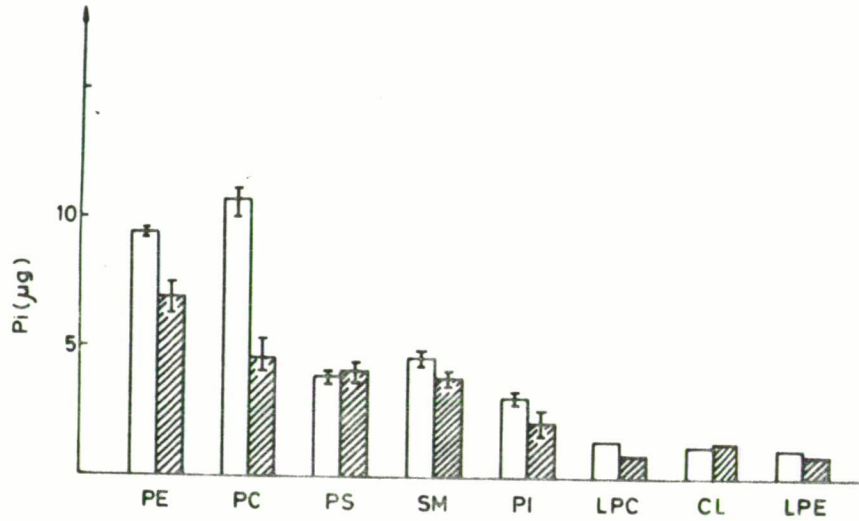
5. ábra: Az össz foszfolipid tartalom változása a plazma-membránban foszfolipáz C kezelés hatására /x 1:10 foszfolipáz C : membrán fehérje arány, o 1:3 foszfolipáz C : membrán fehérje arány/

Hosszabb kezelési idő, vagy nagyobb foszfolipáz C koncentráció alkalmazása az enzim aktivitás mérhetőségét erősen lerontotta. Az elhidrolizált foszfolipidek fő tömege foszfatidilkolin, amelynek változását a 6. ábra mutatja.



6. ábra: PC tartalom változása foszfolipáz C kezelés hatására /x 1:10 foszfolipáz C : membránfehérje arány, o 1:3 foszfolipáz C : membránfehérje arány/

Kisebb mennyiségben a PE is elbomlik, a többi foszfolipid lebomlása nem jelentős. Ezt a változást oszlop diagramon ábráztuk /7. ábra/, melyet kétdimenziós vékonyréteg kromatográfiával állapítottuk meg, az egyes foltok anorganikus foszfor tartalmát mérve.



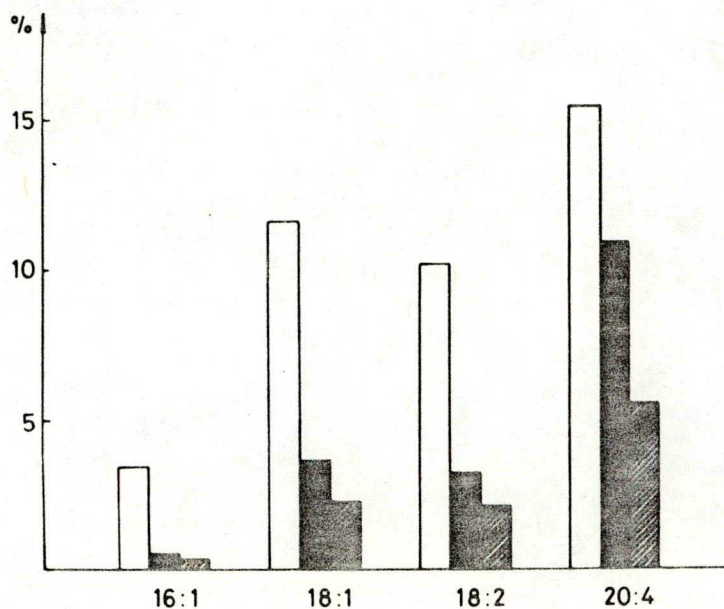
7. ábra: Foszfolipid összetétel változása patkány máj plazmamembránban foszfolipáz C kezelés hatására /□ kontroll, ▨ 10 percig kezelt/

Az 5. és 6. ábra arra enged következtetni, hogy a foszfolipáz C számára a membrán vezikulák külső rétege a hozzáférhető. Gyors emésztődés csak az első néhány percben van, majd jelentősen lelassul a folyamat. Mivel a PC jelentős része a külső rétegben található /49/, így magyarázatot kapunk az 5., 6. ábrán látható görbe lefutására. Hosszabb kezelés hatására ezek a szerkezetek degradálódhatnak, ami megmutatkozott az enzimaktivitás vizsgálatánál.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a foszfolipidek zsirsav összetétele befolyással van-e a hidrolizisre, valamint a zsirsavak telítettsége ill. telítetlensége milyen szerepet játszik a hidrolizisben. A membránok tranziciós állapotát a lipidek határozzák meg elsősorban. Ez függ a zsirsavláncok hosszától, telítettségétől és a fejcsoportok minőségétől. Ez a változás hatással van a membránhoz kapcsolt enzimek működésére. Az enzimaktivitás hőmérséklet-függését nyomonkövetve az aktivitásban változás áll be a membrán tranziciós hőmérsékletén. Az Arrhenius féle ábrázolásban ez jól észrevehető, mivel azon a hőmérsékleten, ahol ez a változás beáll, az egyenesnek töréspontja van.

A kétdimenzióban elválasztott foszfolipidek zsirsavait további gázkromatográfiás vizsgálatnak vetettük alá. Megállapítható volt, hogy azok a foszfolipidek hidrolizálódtak el elsősorban, amelyek telítetlen zsirsavakat tartalmaztak. Ezek közül is kiemelkedtek a palmitolein-, olaj-, linol- és az arachidonsav tartalmu foszfolipidek /8. ábra/.

Egyértelmű, hogy ez a szelekció a PC-t, ill. kisebb mértékben a PE-t érinti. A membrán telített zsirsavú foszfolipidekben gazdagabbá válik, ez főleg a külső rétegben realizálódik, /külső rétegnek a továbbiakban mindig azt a réteget tekintjük a membrán asszimmetrikus voltából eredően, amely a PC döntő többségét tartalmazza/,



8. ábra: Telitetlen zsirsavak arányában bekövetkező változás foszfolipáz C kezelés hatására /kontroll \square , 5 percig kezelt \blacksquare , 10 percig kezelt \hatched /

amelynek következménye bizonyos foku merevedés lehet. Ezt a változást, amely foszfolipáz C kezelés hatására következik be, nyomon követhetjük különböző paraméterek segítségével. Ilyen mutatók a telített /telitetlen zsirsav hányados, vagy a koleszterol/foszfolipid arány.

A II. táblázatban ezeket az adatokat tüntettük fel. A kezelési idő növekedtével mindkét paraméter nő, a számadatok megbízhatóságát ismert mennyiségű dimirisztin-foszfatidil-kolin membránba való beépítésével el-

lenőriztük.

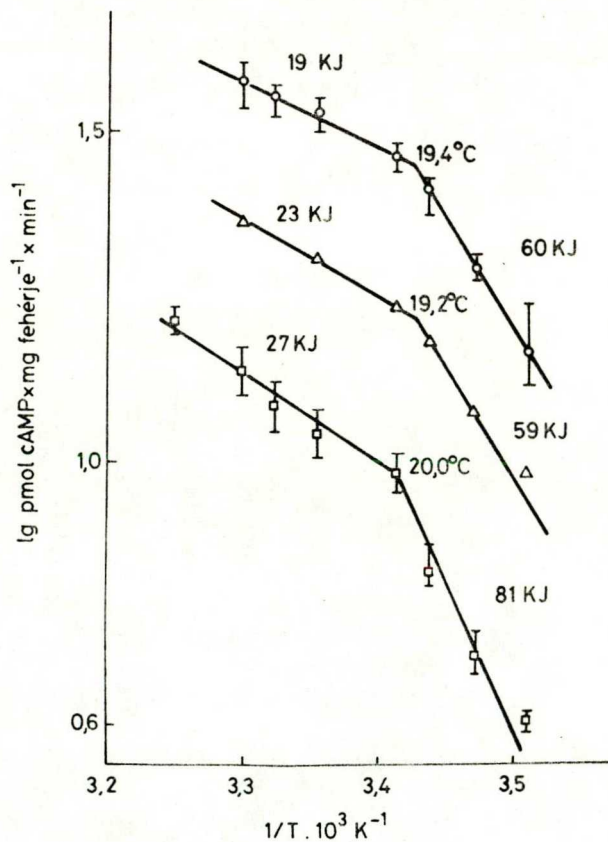
kezelési idő	telített /telítetlen zsírsav hányados	Chol/PL
0 perc	1,33	0,285
5 perc	1,63	—
10 perc	2,90	0,335
10 p + DMPC	4,12	—

II. Táblázat: A foszfolipáz C kezelés hatása a telített : telítetlen zsírsav hányadosra és a koleszterol : foszfolipid hányadosra

Az enzimaktivitás hőmérséklet-függésének nyomkövetése

Amint azt az előzőekben említettem, a tranzíciós állapot változás jól nyomkövethető az Arrhenius kinetika segítségével. A kezeletlen plazmamembrán adenilcikláz alapaktivitásában 20 °C-on mutatkozott törés. Ez jól egyezett a mások által mért adatokkal /20/.

Foszfolipáz C kezelés hatására a töréspont nem tolódott el számottevően. A kezelési idő növekedtével nőtt az enzimaktivitás. Ez a növekedés csak 10 percig tartott, az ennél hosszabb ideig kezelt membránok enzimaktivitás mérése pontatlanabbá válik, az aktivitás visszaesik és nem követi az Arrhenius kinetikát. Ez valószínű, hogy az előzőekben említett membrán szerkezet felbomlására vezethető vissza.



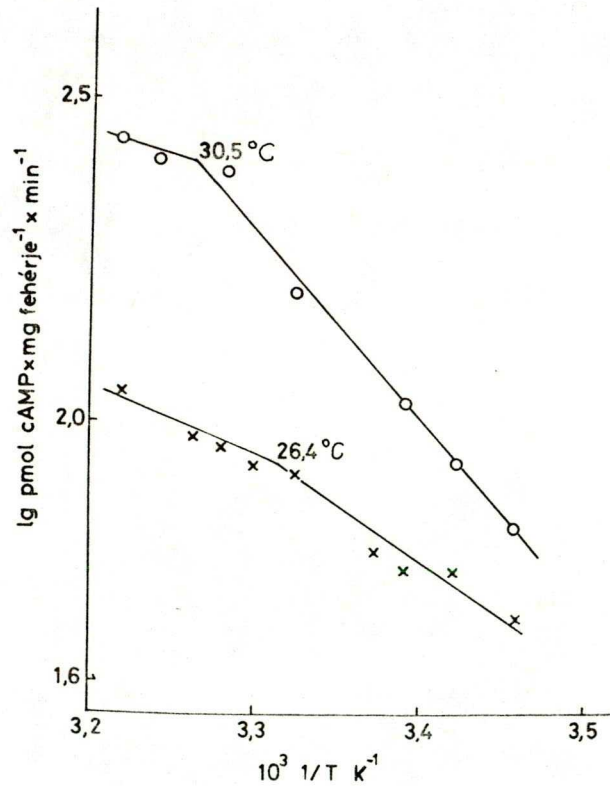
9. ábra: Patkány máj plazmamembrán adenil-cikláz alapaktivitásának Arrhenius-féle ábrázolása $\square-\square-\square$, és ennek változása foszfolipáz C kezelés hatására $\triangle-\triangle-\triangle$ 5 perc, $\circ-\circ-\circ$ 10 perc kezelési idő

A 9. ábrán a kontroll, az 5 percig és a 10 percig kezelt membránok cikláz aktivitása látható a hőmérséklet függvényében. Az alapaktivitáshoz viszonyítva a foszfolipáz C kezelt membránok adenil-cikláz aktiválási energiája mind a töréspont alatt, mind pedig e fölött kisebb. A 10 percig kezelt mintánál a töréspont alatt 60 KJ és ez az érték közelítőleg a 75 %-a az eredeti értéknek. Hasonló a helyzet a töréspont fölött is. Az aktiválási energia csökkenése és az enzimaktivitás növekedése azt sejteti, hogy a foszfolipáz C-vel történt igen szelektív beavatkozás nagymértékben segíti, /ill. létrehozza/ az enzim aktiv állapotának kialakulását.

Ha a rendszerhez glukagont adunk, az Arrhenius egyenes töréspontja a magasabb hőmérsékletek felé tolódik el /19/. Katekolaminok nem változtatják meg lényegesen a töréspont helyét. Ezek a hormonok jelentősen növelik az enzimaktivitást és megváltoztatják az aktiválási energiákat is az alapállapothoz képest /21/. A foszfolipáz C kezelés csökkenti az enzim hormonaktiválhatóságát, és töréspont eltolódás is tapasztalható. Ez arra enged következtetni, hogy a membrán szerkezeti változása befolyással van az enzim aktiválhatóságára, és a savanyu foszfolipideken kívül más foszfolipidek is szerephez jutnak. Az előzőekben leírtakat jól szemlélteti a következő két ábra. A 10. ábrán glukagon stimuláló hatását és annak változását mutatjuk be foszfo-



lipáz C kezelés hatására. A kezeletlen membránok Arrhenius függvényében a 30,5 °C-on található törés azt jelenti, hogy a glukagon jelentős szerkezeti változást idéz elő, ami egy adott mikrokörnyezetben a fluiditás viszonyok ugrásszerű változását idézi elő.

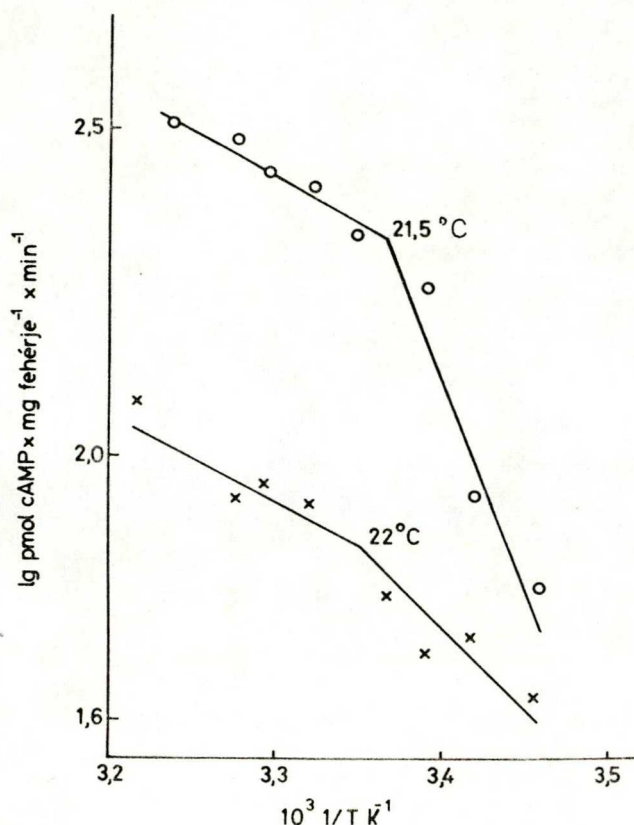


10. ábra: Patkány máj plazmamembrán adenil-cikláz aktivitása: $1,5 \times 10^{-5}$ M glukagon hatására /o-o-o/ és ennek változása 10 perces foszfolipáz C kezelés után /x-x-x/

A foszfolipáz C kezelés rontja az enzim hormon-aktiválhatóságát, és azt a feltevést valószínűsíti, hogy a glukagon által előidézett szerkezeti változás nem ugyanolyan mérvű, mint a kezeletlen membránok esetében. Ennek a szerkezeti változásnak a mértéke, esetleges hiánya jelentkezik a töréspont eltolódásban és az enzimaktiválhatóság romlásában.

Izoproterenol nem okoz olyan nagymérvű töréspont eltolódást, mint a glukagon, de hasonló mértékben növeli az enzimaktivitást. Foszfolipáz C kezelés hasonló mértékben csökkenti az enzim aktivitását, mint azt az előzőekben már láttuk a glukagon esetében. Mindkét esetben szembetűnik az is, hogy a kezelés hatására az enzim aktiválási energiája /a görbék meredekségéből ítélve/ jelentősen csökken a hormonstimulált állapothoz képest. /11. ábra/

Azt a feltevésünket, hogy a membrán szerkezeti változása befolyással van az enzim aktiválhatóságára, valamint azt, hogy a savanyu foszfolipideken kívül /PS, PI/ más foszfolipidek jelentőségéről a következő kísérletünk nyújt támpontot. A foszfolipáz C kezelt membránokhoz különböző mennyiségű és minőségű foszfolipideket adagoltunk a Módszerek c. fejezetben leírt módon, amelyek beépültek a membrán kettősrétegbe, és követtük az enzimaktivitás változását az alap és



11. ábra: Patkány máj plazmamembrán adenil-cikláz aktivitása: 10^{-5} M izoproterenol hatására /o-o-o/, és ennek változása 10 perces foszfolipáz C kezelés hatására /x-x-x/

a foszfolipáz C kezelt állapothoz viszonyítva.

Kezeletlen minták:

- I. 1. alapaktivitás
 2. aktivitás változása 10^{-5} M izoproterenol hatására
 3. $1,5 \times 10^{-5}$ M glukagon hatása az enzim aktivitására
- 10 percig foszfolipáz C kezelt minták:
- II. 1. alapaktivitás
 2. 10^{-5} M izoproterenol hatása
 3. $1,5 \times 10^{-5}$ M glukagon hatása
- III. Különböző mennyiségű PC adagolására bekövetkező változás az enzimaktivitásban, a visszaadagolt foszfolipid mennyiség mg egységnyi membránfehérje tar-

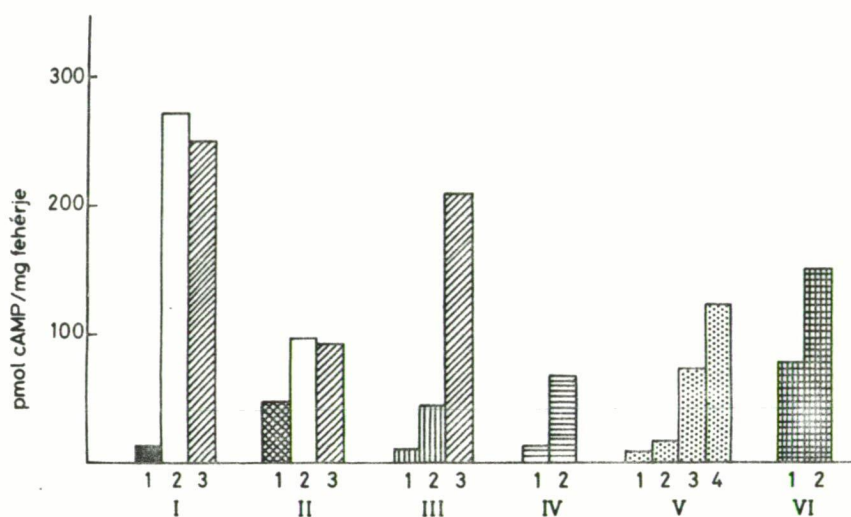
talomra vonatkozik. 1. 250 μg , 2. 125 μg , 3. 125 μg + $1,5 \times 10^{-5}\text{M}$ glukagon.

IV. Különböző mennyiségű PE hatása; 1. 150 μg , 2. 75 μg .

V. PS hatására bekövetkező enzimaktivitás változás;

1. 250 μg , 2. 125 μg , 3. 60 μg , 4. 10 μg .

VI. PI visszaadagolás hatása; 1. 10 μg , 2. 5 μg .



12. ábra: Patkány máj plazmamembrán adenil-cikláz aktivitása 30 °C-on különböző körülmények között

A 12. ábra ezeket a változásokat tünteti fel. Foszfátidilkolin adagolásával vissza lehetett állítani az enzimaktiválhatóságot az eredeti értékre. Kis koncentrációban a foszfátidil-etanolamin növelte, a foszfátidilszerin és a foszfátidilinozit koncentrációtól függően gátolta vagy növelte az enzimaktivitást. Ezek a kísérletek abba az irányba mutatnak, hogy a membrán szerkezeti változása döntő jelentőségű az enzim mű-



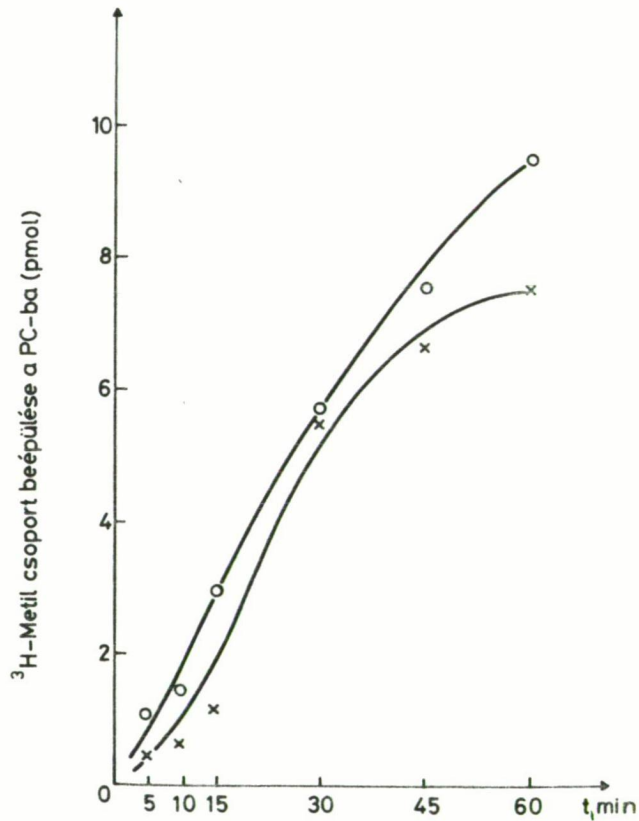
ködésében, és ezáltal szabályozható is. Ez a felismerés vezetett bennünket arra, hogy megvizsgáljuk a foszfolipidek forgalmát a plazmamembránban.

Foszfatidiletanolamin-metiltranszferáz /E.C. 2.1.1.17/ szerepe a plazmamembránban

Hirata és Axelrod már végzett megfigyeléseket a metiláz szerepének tisztázására, hogy az milyen mértékben befolyásolja az adenil-cikláz működését /46, 50/. Arra a következtetésre jutottak, hogy a foszfatidilkolinok jelentős része a plazmamembránokban a PE → PC átalakulásából származik metilálódás útján, és ez a folyamat szerepet játszik az adenil-cikláz aktivitásának változásában. ³H-mal /a metil-csoportban/ jelölt S-adenozil-I-metionint adva az inkubációs elegyhez, ez a folyamat nyomonkövethető.

A 13. ábrából látható, hogy ez a metilálási reakció elég lassu és 10 percnél rövidebb időnél még nem jelentős. A foszfolipáz C kezelt membránokban kezdetben nagyobb a metiláció sebessége, hosszabb reakcióidőket összehasonlítva ez a különbség mérséklődik. A kezeletlen membránokban 10 percnél a PE-ből képződött PC mennyisége nem éri el PC tartalom 1 %-át. A foszfolipáz C kezelt membránokban ez az arány 3 %

körül mozog. a 60. percben a kezeletlen membránokban 15 %, a foszfolipáz C kezelt membránokban 21 % a metilálódás révén keletkezett PC. Ebből az következik, hogy - rövid reakcióidőket véve alapul - a metilálódásból eredő PC-ok nem okozhatnak olyan méretű fluiditás növekedést, amely az adenil-ciklázra jelentős hatást gyakorolna.



13. ábra: A PE → PC metiláció sebessége patkány máj plazmamembránban, kontroll /x-x-x/, és foszfolipáz C kezelt mintákban /o-o-o/. /Az ordináta értékek 1 mg membrán fehérje-tartalomra vonatkoznak./

Az azonban valószínű, hogy a katekolaminok hatására /51, 52/ aktiválódó endogén foszfolipázok által okozott PC veszteség pótlása a PE metilálódása útján történik.

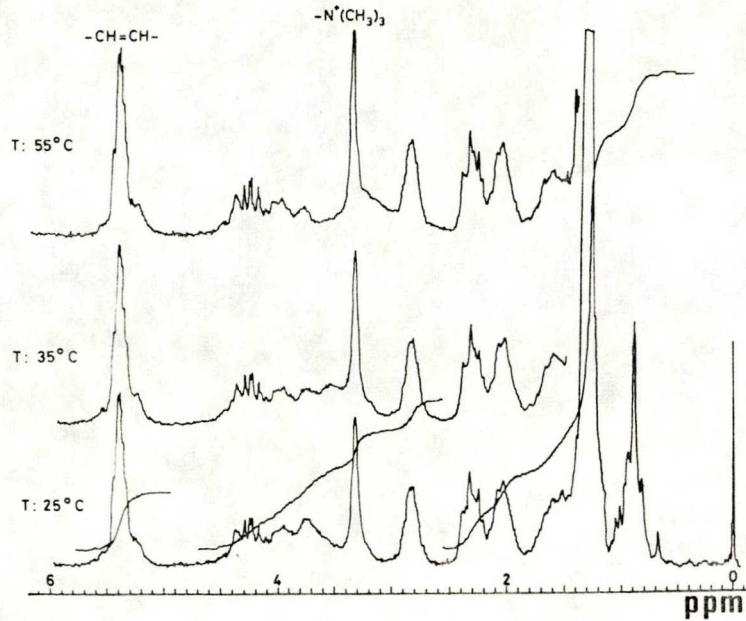
NMR felvételek értékelése

A foszfolipáz C kezelés és a metileződési folyamatok fluiditásra gyakorolt hatását NMR felvételekkel követtük nyomon. Megvizsgáltuk azt is, hogy a hőmérséklet növekedése milyen mértékben hat a fluiditás változására. A vizsgálatokat plazmamembránból kivont összlipideken végeztük. A következő kérdésekre akarunk választ kapni:

- 1./ Az $-N/CH_3/3$ csoport jele mutat-e számottevő amplitudó növekedést $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ között.
- 2./ A foszfolipáz C kezelés hatására milyen változás következik be a spektrumban.
- 3./ A metilálódás hatására - a különböző időközökben felvett spektrumokban - milyen változások észlelhetők.

Az első kérdésre a 14. ábra ad választ. Az ábra alapján azt mondhatjuk, hogy az $-N/CH_3/3$ csoportok jelenek a hőmérséklet növekedés hatására nincs jelentős amplitudó növekedése, inkább a jelek élesedését figyelhetjük meg. Tojáslecitin felvételeknél /15. ábra/

jelentősebb amplitudó növekedés tapasztalható, amely megegyezik az irodalomban közöltekkel /53/.

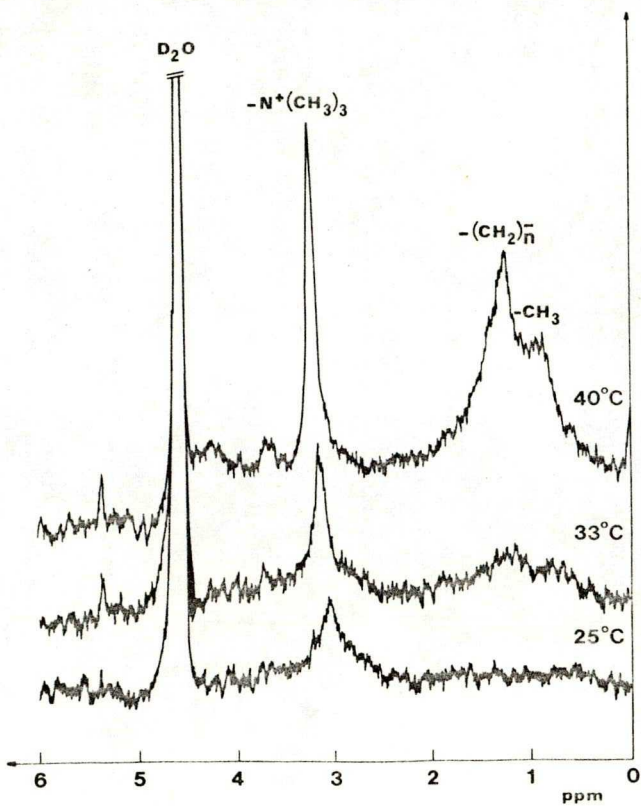


14. ábra: Patkány máj plazmamembránból izolált lipidek NMR felvétele /deuterált kloroformos oldatban/

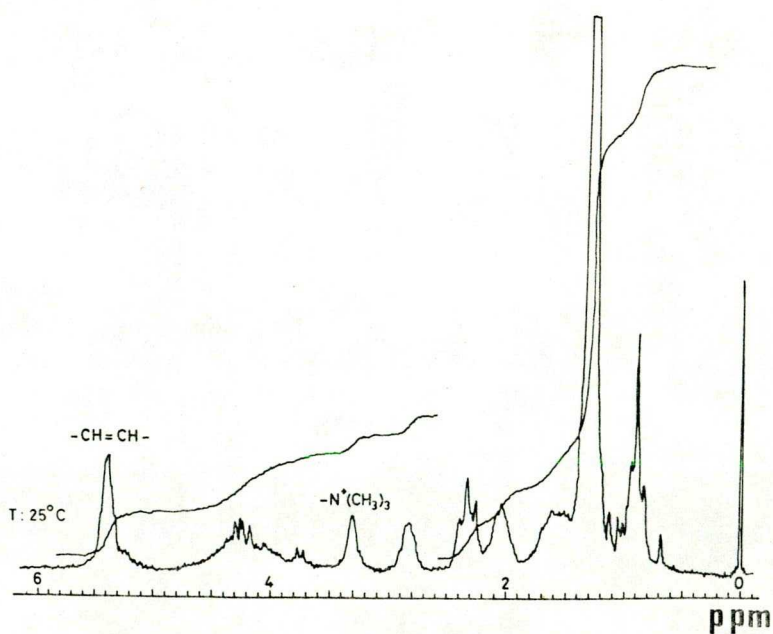
A 14. ábra alapján azt mondhatjuk, hogy a membrán fluiditásában 25 °C fölött a hőmérséklet növekedése nem játszik döntő szerepet, ami azt valószínűsíti, hogy a membrán lipidjeinek átlag tranzíciós pontja 25 °C alatt van.

A foszfolipáz C kezelés hatására a spektrum a várakozásnak megfelelően alakult. Csökkent az $-N/CH_3/3$ jel intenzitása, és nőtt a jel szélessége is. A telített és a telítetlen szénhidrogén kötések jelében nem tapasztalható változás, ami azt jelenti, hogy az emésztés hatására csak az un. fejcsoportok távoznak el a

membránból, a diglicerid részek mozgása a belső réteg felé tendál.

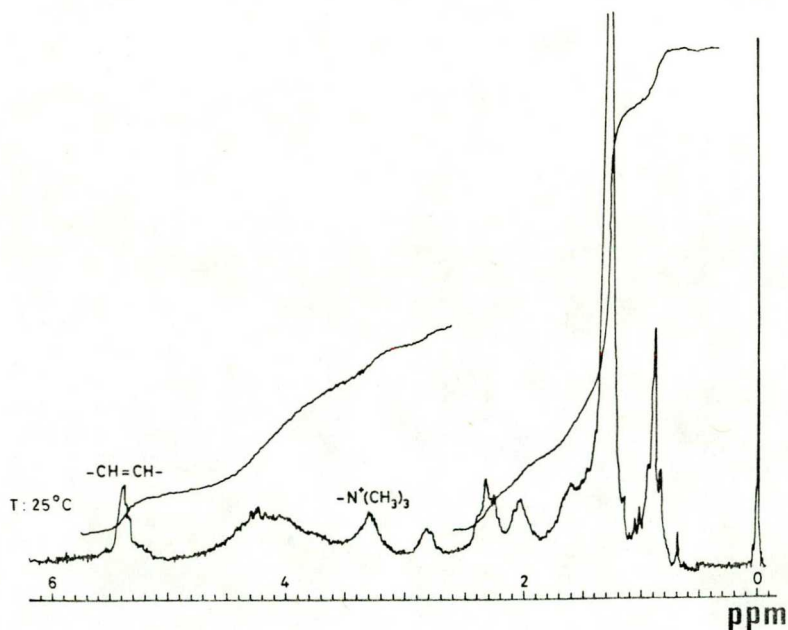


15. ábra: Tojáslecitin deuterált vizes liposzóma NMR felvétele

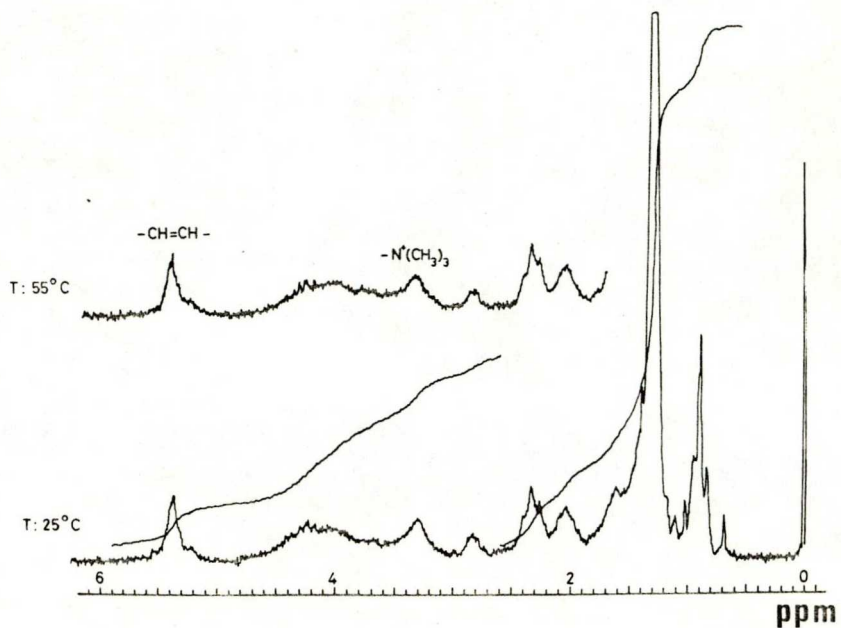


16. ábra: Patkány máj plazmamembrán lipidjeinek NMR felvétele foszfolipáz C kezelés után.

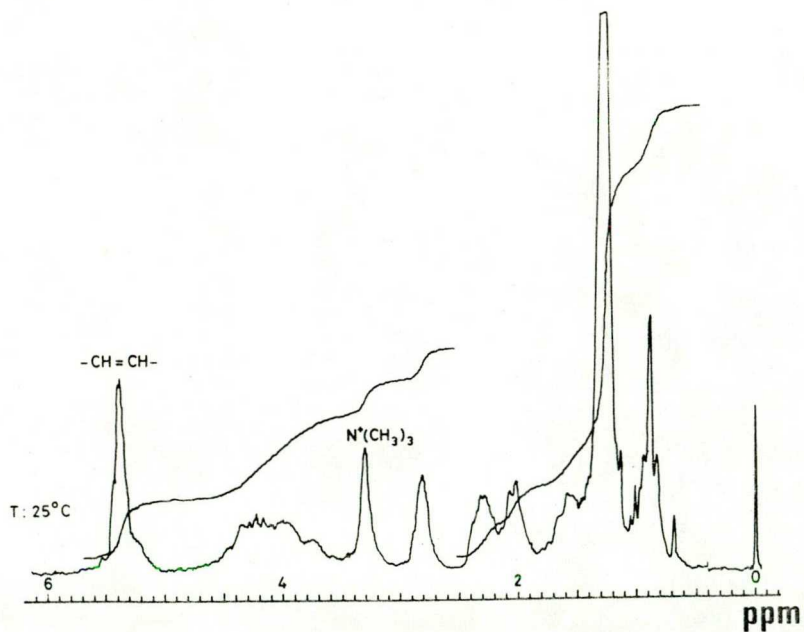
A foszfolipáz C-vel emésztett membránok felvételein az S-adenozil-L-metionin kezelés ill. a metiláz hatása csak igen hosszú idő múlva jelentkezik. A 10 perces kezelés hatása még nem vehető észre, a 30. percben sincs jelentős változás, számottevő különbség csak 60 perces kezelés után jelentkezik. Az NMR felvételek a metilálódási folyamatról jó egyezést mutatnak a jelzett S-adenozil-L-metioninnal végzett kísérlettel. A következő három ábrán sorrendben a 10, 30 és a 60 perces S-adenozil-L-metionin kezelés hatását mutatjuk be foszfolipáz C kezelt membránok lipid felvételein.



17. ábra: Patkány máj plazmamembrán lipidjeinek NMR felvétele 10 perces S-adenozil-L-metionin kezelés után



18. ábra: Patkány máj plazmamembrán lipidjeinek NMR felvétele 30 perces S-adenozil-L-metionin kezelés után



19. ábra: Patkány máj plazmamembrán lipidjeinek MR felvétele 60 perces S-adenozil-L-metionin kezelés után

Összegezve a felvételek alapján adódó válaszokat, azt mondhatjuk, hogy olyan mélyre ható változások egyik esetben sem következtek be, amelyek a membrán szerkezetben fellépő kölcsönhatások megszűnését, a szerkezet megbomlását idézték volna elő. Mind a foszfolipáz C kezelés, mind az S-adenozil-L-metionin hatására részleges változások következtek be.



KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk tett megfigyelésekből és a mások eredményeinek összevetéséből összeállíthatunk egy olyan képet, amely a hormon hatására bekövetkező változást szemlélteti a membrán környezetben, és az adenil-cikláz lehetséges aktiválódási folyamatát mutatja. A kísérletekből először is az tűnik ki, hogy az enzim működése nem egyértelműen két foszfolipidhez kötött /PS, PI/. Az is megállapítható, hogy a környezet jelentős hatással van az adenil-cikláz aktivitására. Ez azt is jelentheti, hogy a membrán morfológiai változása is szerepet játszhat az aktiv állapot kialakításában. Bakardjieva és mts-i hasonló következtetésre jutottak /53/. Az aktiv állapotra valószínű jellemző, hogy az enzim a hidrofób lipid övből a hidrofil régiókba szorul ki, amikor hormonhatás éri. Ezáltal olyan helyzet alakul ki, amelyben a receptor felőli rész mozgásállapota csökken, ugyanakkor a katalitikus alegység környezetében kedvezményezetté válik a helyzet új kapcsolatok kialakítására /54/. Más szavakkal ez azt jelenti, hogy azok a kapcsoló faktorok /GTP és a megfelelő analógok/, amelyek az ATP átalakításához nélkülözhetetlenek, könnyen tudnak kötést kialakítani /55, 56/. Ezt a feltételezést támasztják alá azok a mérések is, amelyek azt állapították meg, hogy az ago-

nisták az entrópia csökkenését idézik elő, míg az antagonisták épp az ellenkező hatást váltják ki a membrán külső rétegében /57, 58/.

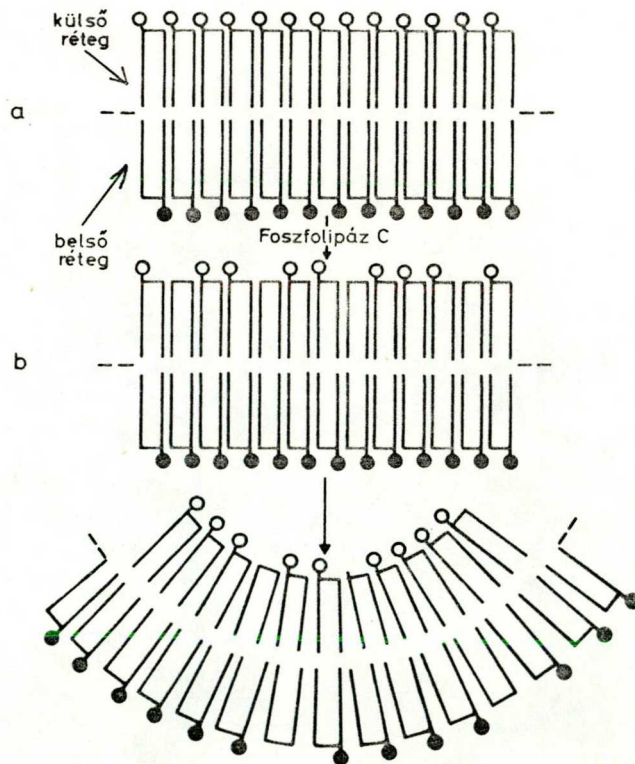
A legújabb méréseink alapján, amelyet ESR technikával végeztünk, azt állapítottuk meg, hogy mind a katekolaminok, mind a foszfolipáz C kezelés hatására a külső réteg rendparamétere nő, ami azt jelenti, hogy a külső réteg rendezettségi állapota nő és a réteg fluiditása csökken /54/.

Mivel a PC a foszfolipid kettős réteg fő alkotórésze, a mennyiségében történő változás nem lehet kihatás nélkül a membrán szerkezetre és az ott elhelyezkedő enzimekre. A 9. ábrából láthattuk, hogy a foszfolipáz C kezelés hatására nem veszi el az enzim az aktivitását, sőt aktivitás növekedés tapasztalható és a szükséges aktiválási energia is csökken. Ez a megállapítás nincs ellentétben azokkal az eddigi kísérletekkel, amelyek foszfolipáz C hatására aktivitás csökkenést tapasztaltak. Ezek a kísérletek jóval hosszabb ideig tartó kezeléseket tartalmaztak, magasabb hőmérsékleten végezték őket és általában nem specifikus foszfolipáz C-t alkalmaztak /15, 31, 32/.

A PC az enzim hormon aktiválhatóságában is szerepet játszik, utalnék itt a 11., 12. ábrára. Akár növeljük, akár csökkentjük a PC szintet, aktivitás csökkenés tapasztalható. Valószínű, hogy azok a PC mo-

lekulák jelentősek, amelyek telítetlen zsírsavakban gazdagok /8. ábra/.

A foszfolipáz C kezelés hatására az Arrhenius kinetikában lényeges töréspont eltolódás nem tapasztalható. Ebből arra lehet következtetni, hogy a külső réteget érintő kezelés hatása kikompenzálódik a belső réteg által, a külső réteg merevedését a belső réteg fluiditás növekedése ellensúlyozza, így az összképben nem látunk változást. Ez megint arra utal, hogy a foszfolipáz C emésztés morfológiai változást idéz elő. Figyelembe véve a R.H. Michell és P. Allan által javasolt modellt /59/, az ábrából ez kézenfekvőnek látszik.



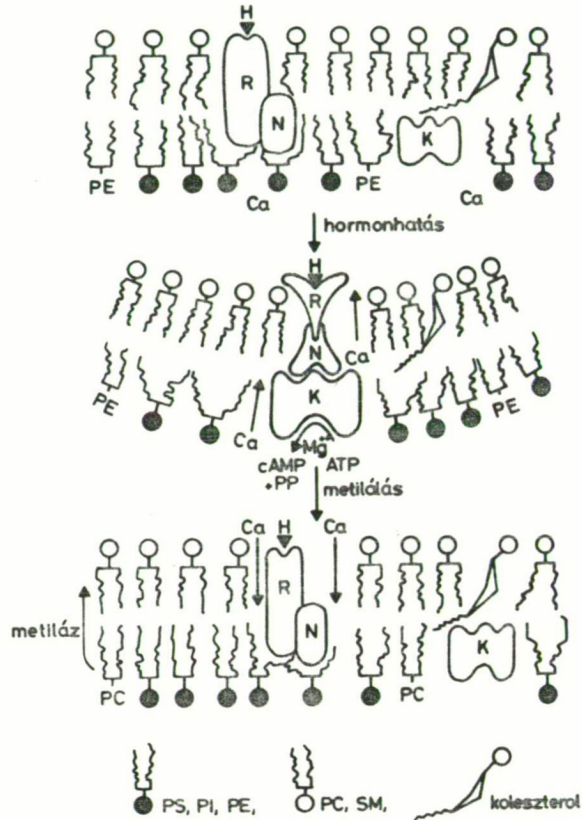
20. ábra: Foszfolipáz C kezelés hatása a membrán szerkezetre /Michell és Allan nyomán/

A foszfolipáz C hatására a külső rétegben csökken a PC fejcsoportok száma, ezt a hiányt egy szerkezeti változás kompenzálja ki. A membránban bemélyedések jönnek létre /negatív görbületek/, így a külső réteg szorosabb illeszkedésű, a belső lazább felépítésű lesz. A metilálódás révén /PE \rightarrow PC/ képződött PC-ok az eredeti szerkezet visszaállítását végzik, ill. azt mondhatjuk, hogy az izoproterenollal indukált, vagy foszfolipáz C kezelés okozta PC veszteség a PE \rightarrow PC átalakulás útján pótlódik, amelyet a foszfolipáz C kezelés és a katekolaminok fokoznak /50, 61, 60/.

A metilálódás útján képződött PC a katekolamin hatásának megszüntetésében is szerepet játszhat, mivel aktiválólagon hat a monoaminoxidázra /62/.

A mások és az általunk kapott kísérleti adatokból megpróbáltunk egy olyan modellt összeállítani, amely az adenil-cikláz aktiv enzim komplex kialakulását jól szemlélteti a jelenlegi ismereteink alapján és nincs ellentmondásban a mások által közölt és az irodalomban elfogadott eredményekkel. Feltételezik, hogy az aktiv adenil-cikláz enzimkomplex három alegységből tevődik össze. Ezek az egységek: a membrán külső rétegéhez asszociálódott receptor /R/, a belső rétegben helyetfoglaló nukleotid regulátor /N/ és az ugyancsak itt található katalitikus alegység /K/, amely normál körülmények között elkülönülten található az R, N egységektől. Ezeknek az alegységeknek

az összekapcsolódása hormon /H/ hatására történik /63/.



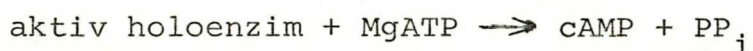
21. ábra: Az adenil-cikláz enzim komplex kialakulásának feltételezett módja

Feltételezzük, hogy hormonhatásra hasonló szerkezeti változás jön létre a membránban, mint azt korábban a foszfolipáz C hatásánál láttuk. Ennek eredményeképp alakulhat ki a $H + R.N \rightarrow H.R.N^X$ aktiv komplex. Ennek az állapotnak a kialakulásában és fenntartásában jelentőséget tulajdonítunk annak a hatásnak, hogy az agonisták a rendezettségi állapot növekedését /entrópia csökkenését/ idézik elő a membrán külső rétegében, míg az

antagonisták épp az ellenkező hatást váltják ki /57, 58/.
A következő lépésként kialakul a H.R.N.GTP komplex és
ezzel egyidőben a katalitikus alegység kapcsolódása is
megtörténik a nukleotid regulátor egységhez, ilymódon
kialakul egy



A folyamat egyik hatóerejének tekintjük a katalitikus
alegység megnövekedett mozgásszabadságát, valamint
az ion környezet változását. Ennek megfelelően a szubsz-
trát átalakítása a következő folyamattal írható le:



A membránszerkezet előzőekben vázolt dinamikus
változása in vitro és in vivo is részt vehet az enzimek
aktiv állapotának kialakításában, ugyanakkor gátlásuk-
ban is, és a membránon keresztül történő transzport-
folyamatok szabályozásában.

IRODALOM

1. Sutherland E.W., Rall T.W., J. Am. Chem. Soc. 79. 3608 /1957/
2. Haynes R.C., Sutherland E.W., Rall T.W., Recent Progress in Hormon Res. 15. 121-132 /1960/
3. Sutherland E.W., J. Biol. Chem. 232.1077 /1958/
4. Greengard P., Robinson G.A., Advances in Cyclic Nucleotide Res. 3.11. /1973/
5. Jacobs S., Cuatrecasas P., TIBS dec. 280-282 /1972/
6. Drummond G.I., Duncan L., J. Biol. Chem. 245. 976-983 /1970/
7. Drummond G.I., Severson D.L., Duncan L., J. Biol. Chem. 246.4166-4173 /1971/
8. Birnbauer L., Pohl S.L., Rodbell M., J. Biol. Chem. 244.3468-3476 /1968/
9. Schammandinger J. " A lac-operon,1975" A biológia aktuális problémái 7. Medicina, Budapest, 1976.
10. Litwack G., Singer S. : Subcellular actions of glucocorticoids /In Litwack G. Biochemical actions of hormones. Acad. Press. New York 1972./
11. Exton J. H., Biochem. Pharm. 28.2237-2240 /1979/
12. Davson H., and Danielli J.F., The permeability of natural membranes. Cambridge University Press. London /1943/
13. Singer S.J., Nicolson G.L., Science 175.720-731 /1972/
14. Van Deenen L.L.M., Progr. Chem. Lipids 8./3/ 1 /1965/
15. Rubalcava B., Rodbell M., J. Biol. Chem.248.3831-3837 /1973/
16. Tanaka R., Teruja A., BBA 323. 583-591 /1972/
17. Jurtshuk P., Schuzu I., Green D.E., Biochem. Biophys. Res. 6. 76-78 /1961/
18. Fleischer S., Klouwen H., Brerley G., J. Biol. Chem. 236. 2936-2941 /1961/

19. Houslay M.D., Metcalfe J.C., Warren G. B., Hesketh T.R., Smith G.A., BBA 436. 489-496 /1976/
20. Pliego J.A., Rubalcava B., Biochem. Biophys. Res. Comm. 80. 609-615 /1978/
21. Bär H-P., Mol.Pharm. 10.597-604 /1974/
22. Orly J., Schramm M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72.3433-3437 /1975/
23. Ray Z.K., Tomasi V., Marinetti G.V., BBA 211. 20-30 /1970/
24. Dipple I., Houslay M.D., Biochem J. 174.179-190 /1978/
25. Kreiner P.W., Keirns J.J., Bitensky M.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70. 1785-1789 /1973/
26. Emmelot P., Bos C.J., BBA 249. 285-292 /1971/
27. Katz M.S., Kelly T.M., Pineyro M.A., Gregeman R.I., J. of Cyclic Nucleotide Res. 5.389-407 /1978/
28. Bukowiecki L., Follea N., Vallieres J., Leblanc J. Eur. J. Biochem. 92.189-196 /1978/
29. Pastan I., Macchia V., Katzen R., J. Biol. Chem. 243 3750-3755 /1967/
30. Taguchi R., Ikezawa, Arch. Biochem. Biophys. 186. 196-201 /1978/
31. Levey G.S., Biochem. Biophys. Res. Comm. 43.108-113 /1971/
32. Réthy A., Tomasi V., Barnabei O., BBA 290. 58-69 /1972/
33. Levey G.S., Biochem. Biophys. Res. Comm. 43. 108-113 /1971/
34. Klein I., Moore L., Pastan I., BBA 506.42-53 /1978/
35. Engelhard V.H., Glaser M., Storm D.R., Biochemistry 17.3191-3200 /1978/
36. Engelhard V.H., Esko J.D., Storm D.R., Glaser M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73.4482-4486 /1976/
37. Williams E., Sears B., Allerhand A., Cordes E.H., J. Am. Chem. Soc. 95. 4871 /1974/

38. Levey G.C., Komorski R.A., Halsread J.A.,
J. Am. Chem. Soc., 96. 5456 /1974/
39. Iavis J.H., Maraviglia B., Weeks G., Godin B.V.,
BBA 550. 364-467 /1979/
40. Seeling I., BBA 515. 105-140 /1978/
41. Neville D.M., BBA 154. 540 /1968/
42. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall
R.J., J. Biol. Chem., 193. 265 /1951/
43. Counis R., Mongongu S., Anal. Biochem. 84. 179-185
/1978/
44. Rouser G., Fleischer B., Yamamoto H., Lipids 5.
494 /1970/
45. Rousseau A., Gatt S., J. Biol. Chem. 254. 7741-7745
/1979/
46. Hirata F., Axelrod J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
75. 2348-2352 /1978/
47. Ray T.K., Skipski V.P., Barklay M., Essner F.,
Archibald F.M., J. Biol. Chem. 244. 5528-5536 /1969/
48. Breuer J., MTA Biol. Oszt. Közl. 21. 157-162 /1978/
49. Higgins J.A., Dawson R.M.C., BBA 470. 342-370 /1977/
50. Hirata F., Strittmatter W.J., Axelrod J.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76. 368-372 /1979/
51. Nemezc Gy., Farkas T., Biochem. Pharm. közlésre el-
fogadva
52. Franson R.C., Pang D.C., Weglicki W.B.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 90. 956-962 /1979/
53. Bakardijieva A., Galla H.J., Helmreich E.J.M.,
Biochemistry 18. 3016-3023 /1979/
54. Nemezc Gy., Farkas T., kézirat előkészületben
55. Cassel D., Selinger Z., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
75. 4155-4159 /1978/
56. Rimon G., Hanski E., Braun S., Levitzki A.,
Nature 276. 394-396 /1978/
57. Weiland G.A., Minneman P., Molinoff P.B., Nature 281
114-117 /1979/



58. Strasberg A.D., Vauquelin G., Duneu-Tratmann O.,
Delavier-Klutchko C., Battari S., Andre C.,
TIBS january 11-14 /1980/
59. Allan P., Thomas P., Michell R.H., Nature 276.
289-290 /1978/
60. Allan P., Lax M.G., Fineau J.B., Michell R.M.,
BBA 413. 309-316 /1975/
61. Simpkins H., Panko E., Tay S., Biochemistry 10.
3851-3855 /1971/
62. Pyatiovitskaya E.V., Valdhiece A.T., Bergelson L.D.,
Biochimija 44. 1826-1829 /1979/
63. Rodbell M., Nature 284. 17-22 /1980/

Hálás köszönetemet fejezem ki dr. Farkas Tibor tudományos főmunkatársnak munkám során nyújtott sokoldalú segítségéért és támogatásáért.

Köszönetet mondok dr. Kiss Zoltán tudományos munkatársnak a preparátumok készítésében nyújtott segítségéért és a sok értékes tanácsáért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Wollemann Mária tudományos tanácsadónak a dolgozat elkészítésénél nyújtott hasznos észrevételeiért és tanácsaiért.