

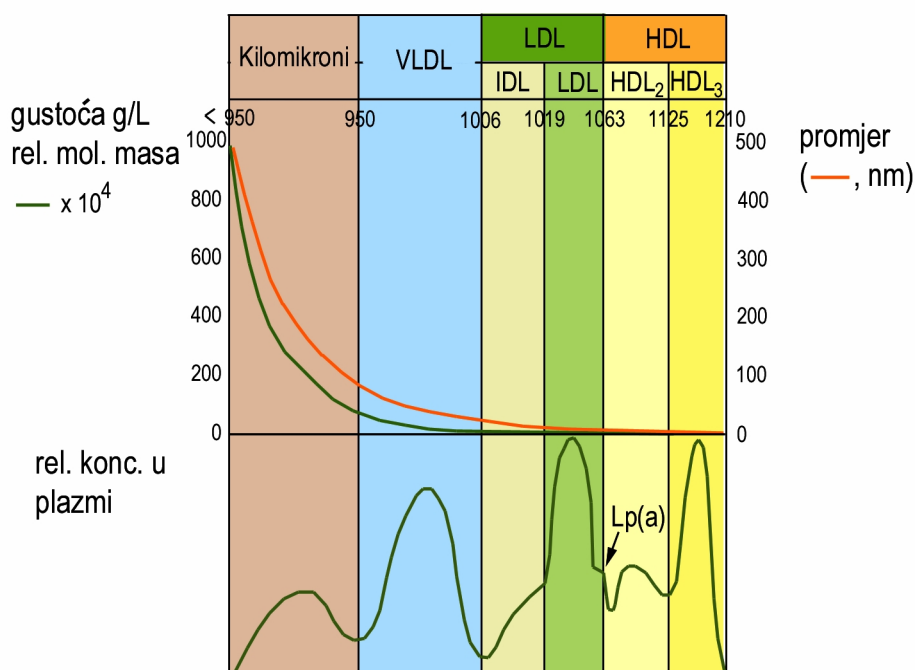
Fizička organizacija lipoproteina

Janko Herak

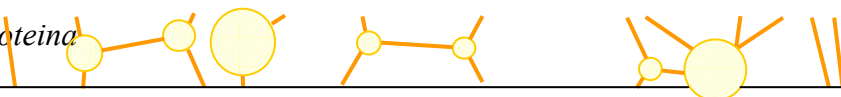
Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb

Lipoproteini

Pod pojmom *lipoproteini* obično podrazumijevamo čestice sastavljene od lipida i proteina, koje nalazimo u krvnoj plazmi. Bolji bi i točniji naziv za te čestice bio *lipoproteini iz krvi plazme* ili *serumski lipoproteini*, no mi ćemo ovdje upotrebljavati prvi, najjednostavniji naziv. Po kemijskom sastavu lipoproteini su srodni membranama. Dok membrane (stanične i unutarstanične) obavljaju vrlo raznoliku funkciju, bitnu za rad svake biološke stanice, lipoproteini su u biti prenositelji lipida do svih stanica organizma. Lipidi (često popularno zvani i „masti”), sastavni su dio staničnih membrana, ali služe i kao „sirovina” za sintezu mnogih biološki važnih molekula, između ostaloga cijelog niza hormona. Kako su lipidi netopivi u vodi, dakle i u krvi, za njihov put iz želuca i crijeva, kuda dođu uzimanjem hrane, lipidi se u organizmu združuju sa specifičnim proteinima u lipoproteinske čestice „topive” u krvnoj plazmi. U stvari, radi se o disperziji, a ne o pravoj otopini lipoproteina. Golemo zanimanje za lipoproteine iz krvne plazme potječe ne samo iz znanstvene znatiželje za upoznavanjem njihove funkcije u normalnim biološkim procesima, nego i zbog spoznaje da lipoproteini sudjeluju u procesu aterogeneze, dakle oboljenja srca i krvnih žila. Kao što je poznato, ateroskleroza je najveći uzročnik smrtnosti u razvijenim zemljama svijeta.



Slika 12-1: Spektar čestica lipoproteina (relativna koncentracija), prikazan u odnosu na gustoću (Science Press 2002).



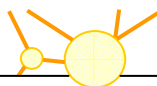
Najčešći način izdvajanja lipoproteina iz krvne plazme je primjenom snažnih centrifuga. U centrifugi se sve krvne sastavnice razvrstavaju prema svojoj masi i gustoći. Za odvajanje lipoproteina kao supramolekulskih čestica potrebna su jaka centrifugalna polja ($\omega^2 r \approx 10^5 g$), što se postiže u posebno konstruiranim rotorima vrlo brzom vrtnjom u ultracentrifugama. Na slici 12-1 prikazan je profil lipoproteina uravnoteženih u gradijentu gustoće otapala u ultracentrifugi. Mogu se uočiti diskretni razredi lipoproteina, razvrstani prema gustoći. Najveće lipoproteinske čestice, ujedno i čestice najmanje gustoće nazivamo kilomikronima (CM). Nešto manje čestice nazivamo lipoproteinima vrlo male gustoće, najčešće poznate pod akronimom VLDL (od engleskog *Very Low Density Lipoprotein*). Još manje i gušće čestice su lipoproteini male gustoće (LDL – *Low Density Lipoprotein*), a najgušće i najmanje čestice su lipoproteini velike gustoće, HDL (od engl. *High Density Lipoprotein*). Neka osnovna svojstva svih razreda lipoproteinskih čestica prikazana su u Tablici 12-1.

Tablica 12-1: Sastav i svojstva ljudskih lipoproteina

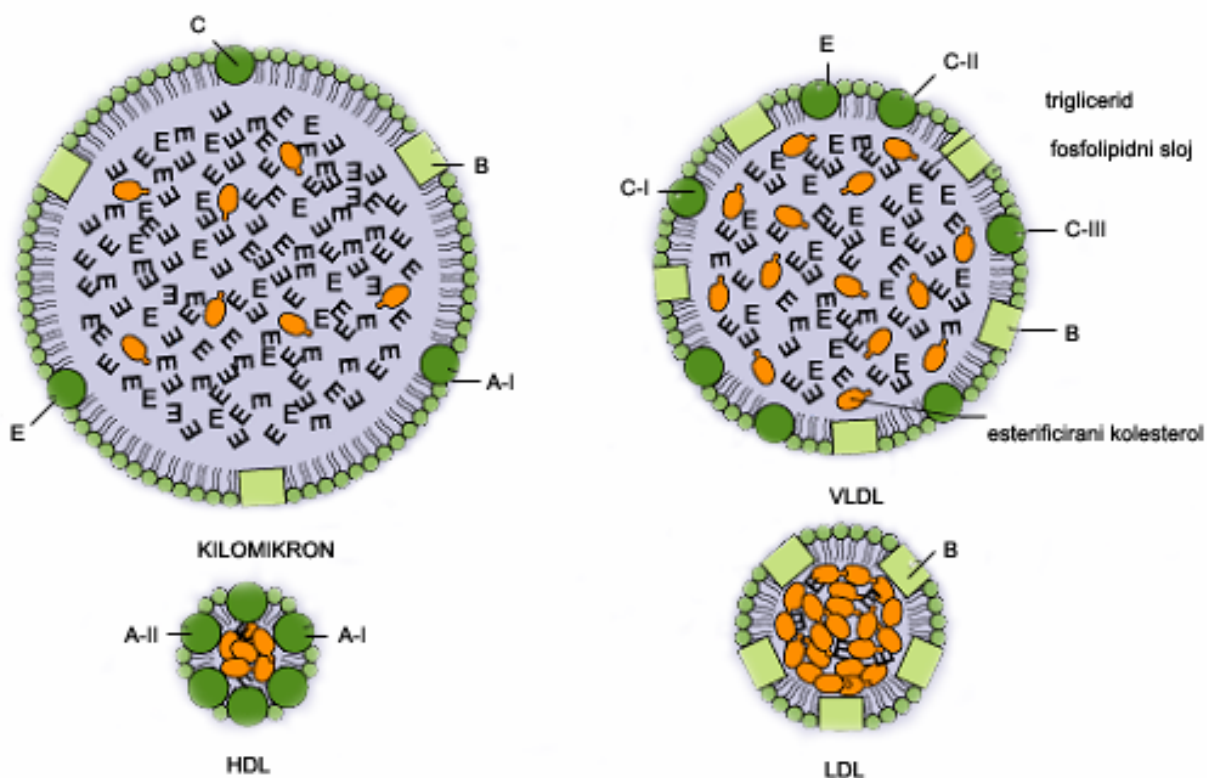
Lipoprotein	Gustoća (g/mL)	Promjer (nm)	Protein	Fosfolipid (maseni udio, %)	Triglicerid (maseni udio, %)	Kolesterol
HDL	1.063- 1.21	5 – 15	33	29	8	30
LDL	1.019 – 1.063	18 – 28	25	21	4	50
IDL	1.006- 1.019	25 – 50	18	22	31	29
VLDL	0.95 – 1.006	30 – 80	10	18	50	22
Kilomikron	< 0.95	100 - 500	1 - 2	7	84	8

Molekulska organizacija lipoproteina

Svi razredi lipoproteina, bez obzira na veličinu i kvantitativni odnos lipida i proteina imaju neka zajednička svojstva. Svi lipoproteini imaju u svom sastavu jedan ili više dobro definiranih proteina, koje obično nazivamo *apoproteinima* ili *apolipoproteinima*. Proteini iz sastava lipoproteina (apoproteini), imaju neke dijelove organizirane u obliku uzvojnice, a neke druge u obliku nabranog lista. Do takve se spoznaje došlo uglavnom iz analize primarne strukture (sastava i redoslijeda aminokiselina u proteinskom lancu) apoproteina. Kao što se može i pretpostaviti, o trodimenzijskoj strukturi i organizaciji apoproteina u česticama lipoproteina nema vrijednih informacija iz standardne rentgenske strukturne analize, naprosto zato što kvalitetna analiza tako kompleksnih sustava kao što su lipoproteini nije napravljena, iako je bilo mnogo pokušaja. Pa ipak, pouzdani podaci o sekundarnoj strukturi (konformaciji pojedinih dijelova proteinskih lanaca) dobiveni su analogijom s podacima u drugim, bolje poznatim proteinima, dostupnim znanstvenoj javnosti.

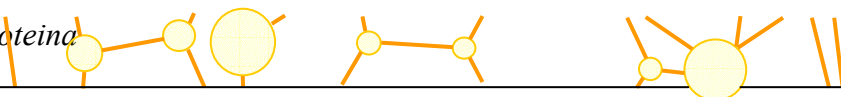


Lipidna komponenta lipoproteina sadrži četiri tipa molekula, u različitom omjeru u različitim razredima lipoproteina. Svi lipoproteini imaju u svom sastavu fosfolipide, kolesterol, esterificirani kolesterol i trigliceride. Poznavajući svojstva ovih kategorija lipida može se pouzdano sačiniti opći model lipoproteina. Fosfolipidi, zbog svojstva amfipatičnosti (jedan kraj molekule je polaran a drugi apolaran) sasvim sigurno zajedno s proteinima čine vanjsku ovojnicu lipoproteina. Pritom su polarne glave fosfolipida izložene vodenom mediju, a apolarni krajevi okrenuti prema unutrašnjosti. Esterificirani kolesterol i trigliceridi velike su nepolarne molekule i sasvim sigurno su daleko od vrlo polarnog medija, otapala; smještene su negdje u sredini čestice. Kolesterol je blago polaran, pa može biti i na površini i u unutrašnjosti čestice. Na temelju ovakve analize i činjenice da se radi o kvazikuglastim česticama (što je poznato iz snimaka elektronskom mikroskopijom), dobivena je opća slika čestica lipoproteina, što je prikazano na slici 12-2.



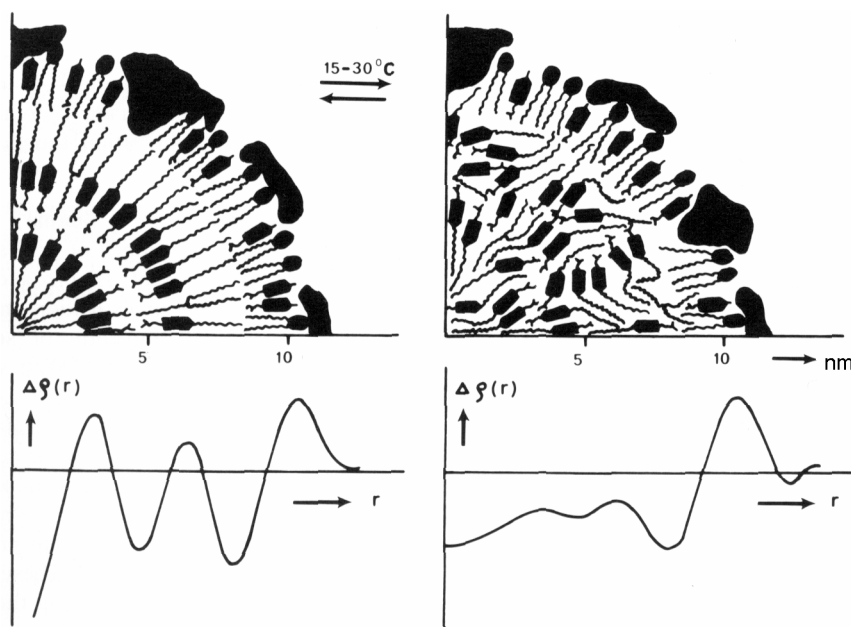
Slika 12-2: Shematski prikaz molekulske organizacije u četiri razreda lipoproteina. Na slici su i standardne oznake za apoproteine prisutne u pojedinim vrstama čestica. Odnos veličine čestica na slici ne odgovara stvarnom odnosu veličina (Science Press 2002).

No detaljna organizacija različitih molekula u česticama različita je u različitim razredima lipoproteina. Do detaljnijih podataka o strukturi i organizaciji lipoproteinskih čestica došlo se primjenom i drugih metoda. Spektroskopskim metodama, metodama strukturne analize i različitim kemijskim, biokemijskim i imunololškim metodama posebno su se proučavale molekule i dijelovi molekula dostupni vodenom mediju, a posebno molekule koje se nalaze u jezgri lipoproteina. Na taj se način stekla općenita slika o organizaciji molekula i molekulskim interakcijama u česticama. Danas najviše znamo o detaljima strukture lipoproteina male gustoće (LDL).



Struktura i molekulska organizacija LDL-a

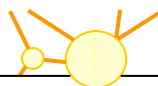
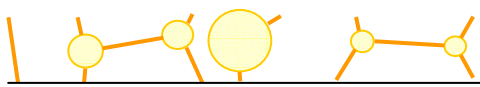
Kilomikroni i VLDL uključeni su u prijenos i odlaganje triglicerida u tkiva u organizmu. VLDL, LDL i HDL odgovorni su za prijenos i opskrbu stanica kolesterolom. U tim metaboličkim putovima LDL igra ključnu ulogu jer kao cjelina ulazi u stanice koje imaju potrebu za kolesterolom. Stoga je učinjen golem napor da se spozna mehanizam ulaska LDL-a u stanicu i njegova daljnja sudbina u stanici. Ubrzo se pokazalo da LDL može biti biološki odstranjen iz krvi i drugim mehanizmom, ulaskom u međustanični prostor u stijenci arterija, odakle se odstranjuje djelovanjem posebnih stanica, makrofaga. Dio LDL-a ostaje u arteriji trajno, sudjelujući zajedno sa stanicama mišićnih vlakana i makrofaga u tvorbi trajnih makroskopskih nakupina – ateroma, ključnog elementa ateroskleroze. Upravo ova spoznaja potaknula je mnoštvo znanstvenika različitih profila na istraživanje svojstava LDL-a, uključujući detalje strukture ovih čestica.



Slika 12- 3: Shematski prikaz presjeka modela LDL-a, u uređenoj fazi (lijevo) i neuređenoj fazi (desno), sačinjen na temelju radijalne raspodjele elektronske gustoće (prikazane na donjem dijelu slike)

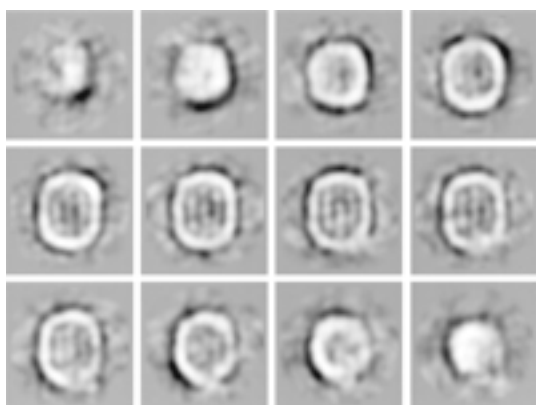
Rezultati istraživanja LDL-a raspršenjem rentgenskih zraka pod malim kutom [1] potvrdili su strukturiranje ovog lipoproteina u skladu s općom slikom, predloženom na slici 12-2. Analiza je pokazala sferičnu raspodjelu elektronske gustoće u čestici. Na temelju toga predložen je i detaljniji model strukture LDL čestice, prikazan na sl. 12-3 (lijeva strana). U međuvremenu se kalorimetrijskim mjerenjima utvrdilo da u LDL-u postoji termotropski fazni prijelaz [2]; LDL mijenja svoju uređenost pri temperaturnom prijelazu na oko 25 °C. Ubrzo nakon toga i pokusi s raspršenjem rentgenskih zraka pod malim kutom potvrdili su postojanje drugačije organizacije unutrašnjosti lipoproteina na temperaturi ispod faznog prijelaza od one na temperaturi iznad faznog prijelaza (fiziološkoj temperaturi), što je ilustrirano na sl. 12-3.

Kada je određena primarna struktura jedinog apoproteina iz sastava LDL-a, apoproteina B, pokušala se analogijom s već poznatim proteinima odrediti njegova



sekundarna struktura [3]. To nije bio nimalo jednostavan posao jer je apoprotein B jedan od najvećih poznatih proteina, sastavljen od 4536 aminokiselina. Iz sekundarne strukture može se računanjem hidrofobičnosti fragmenata u lancu proteina predvidjeti njegov smještaj u LDL čestici, asocijaciju s lipidima te vjerojatna mjesta interakcije s receptorskim proteinom u membrani stanice prilikom njegova ulaska u stanicu. Osim manjih potpuno hidrofilnih ili hidrofobnih segmenata, većina apoproteina ima amfipatična područja, pogodna bilo za tvorbu amfipatičnih uzvojnica (α) ili amfipatičnih motiva u obliku nabranih listova (β). Domene su poredane u nizu NH_2 - $\beta\alpha_1$ - β_1 - α_2 - β_2 - α_3 - COOH . Iz duljine tih domena i njihovih svojstava moglo se pretpostaviti kako je apoprotein B namotan po površini LDL čestice.

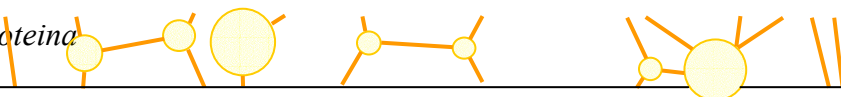
Primjenom elektronske kriomikroskopije potvrđena je relativna raznolikost (nehomogenost) LDL čestica. Od mnoštva mikroskopskih slika odabrano je nekoliko tisuća, za koje se smatralo da bi mogle pripadati istoj podskupini LDL čestica. Na nekima od njih uočene su po tri poprečne pruge u unutrašnjosti čestica, što se dobro vidi na slici 12-4. [4]



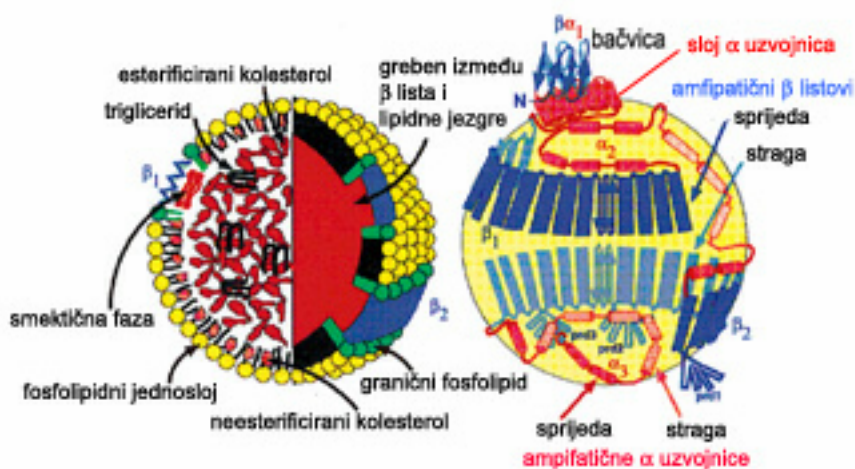
Slika 12-4: Elektronska kriomikroskopska slika nekoliko presjeka LDL-a različitih orijentacija

Ove su slike shvaćene kao različite orijentacije istovrsnih čestica, pa je matematičkom rekonstrukcijom napravljen trodimenzijski model LDL čestice. Iako je slika dosta gruba (razlučivanje oko 2,7 nm), pokazalo se da je ova podskupina čestica elipsoidnog oblika, dimenzija 25 x 21 x 17,5 nm. Nadalje, potvrđena je velika elektronska gustoća u vanjskom omotaču čestice, što je bilo poznato još od prvih pokusa s raspršenjem rentgenskih zraka pod malim kutom. Sasvim je razvidno da na niskim temperaturama lipidna jezgra nije kuglaste simetrije. Pruge veće elektronske gustoće pripisuju se organizaciji esterificiranog kolesterola u smektičkoj fazi. Iz ovih, kriomikroskopskih mjerenja nije moguće ništa pobliže doznati o obliku LDL čestica i organiziranosti kod fiziološke temperature.

Dvije skupine istraživača uspjele su napraviti monokristale LDL čestica. Standardni pokusi raspršenja rentgenskih zraka na kristalu dali su dosta grub difraktogram, koji je omogućio analizu s razlučivanjem od oko 2,7 nm [5]. Rekonstruirana slika dobivena na temelju ovih podataka u osnovnim se crtama podudara s onom dobivenom elektronskom kriomikroskopijom.



Na temelju svega poznatoga sačinjen je trodimenzijski model LDL-a prikazan na sl. 5. [6]



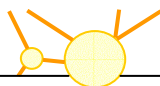
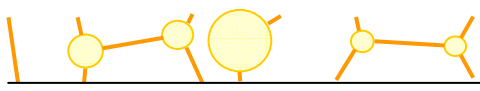
Slika 12-5: Shematski prikaz trodimenzijskog modela LDL-a. Lijevo strana prikazuje očekivanu organizaciju lipida, a desna strana očekivanu organizaciju apoproteina B na površini LDL čestice

Lijevo strana prikazuje organizaciju lipida, uključujući i granično područje između lipida i β_1 lista, područja koje vjerojatno sadrži i nešto esterificiranog kolesterola u smektičkoj fazi čak i kod fiziološke temperature. Desna strana prikazuje organizaciju apoproteina B na površini LDL čestice. Uočava se dio β_{a1} domene u obliku bačvice, tri skupine izvan površine lipoproteina, bogate prolinom (prd), te pojas sastavljen od amfipatičnih α uzvojnica i β listova koji ovija česticu.

Predloženi model sačinjen je 2001. godine. U posljednje četiri godine nema novih rezultata koji bi bitno doprinijeli poboljšanju modela.

Literatura

- [1] P. Laggner and K. W. Müller, The structure of serum lipoproteins as analyzed by X-ray small angle scattering, *Q. Rev. Biophys.* 11, 371 (1978).
- [2] R. J. Deckelbaum, G. G. Shipley, D. M. Small, R. S. Lees and P. K. George, Thermal transitions in human low density lipoproteins, *Science* 252, 744 (1977).
- [3] Y. C. Yang, S. H. Chen, S. H. Gianturco, W. A. Bradley, J. T. Sparrow, M. Tanimura, W. H. Li, D. A. Sparrow, H. DeLoof, et al., Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B, *Nature* 323, 798 (1986).
- [4] E. W. Orlova, M. B. Sherman, W. Chiu, H. Mowri, L. C. Smith and A. M. Gotto, Jr., Three dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8420 (1999).



[5] V. Y. Lunin, N. L. Lunina, S. Ritter, I. Frey, A. Berg, K. Diederichs, A. D. Podjarny, A. Urzhumtsev and M. W. Baumstark, Low-resolution data for low-density lipoprotein particle, *Acta Cryst.* D57, 101 (2001).

[6] P. Segrest, M. K. Jones, H. De Loof and N. Dashti, Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins, *J. Lipid Res.* 42, 1346 (2001).

12. Fizička organizacija lipoproteina

