

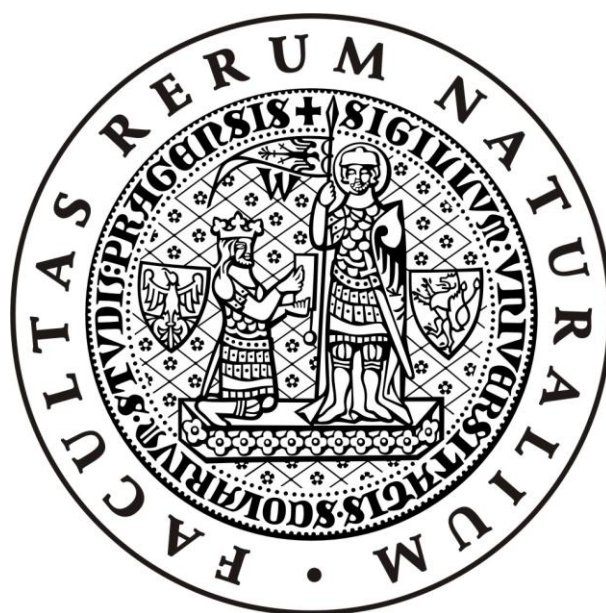
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Markéta Jirátová

Regulace produkce VLDL v játrech

Regulation of VLDL production in the liver

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jan Kovář, CSc.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 11. 5. 2012

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za trpělivost, pomoc a projevený zájem při zpracovávání této bakalářské práce. Dále pak svému příteli, rodině a přátelům za důvěru a podporu nejen při psaní této práce.

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o syntéze částic VLDL (lipoprotein o velmi nízké hustotě).

První část této práce stručně shrnuje základní charakteristiky lipidů a lipoproteinů. Tuky jsou pro organizmy nejvýhodnějším zdrojem energie. Lipoproteiny jsou makromolekulární komplexy určené k přepravě hydrofobních tuků v plazmě. Rozdělují se dle hustoty na chylomikrony, VLDL, IDL, LDL a HDL.

Druhá část práce se zaměřuje na strukturní peptidové složky lipoproteinů, apolipoproteiny. Shrnuje charakteristiky a funkce základních tříd apolipoproteinů. Největší pozornost je věnována apolipoproteinům B, které mají zásadní roli pro syntézu VLDL.

Vlastní regulace syntézy VLDL a její průběh je rozebrán ve třetí části práce. Syntéza VLDL se odehrává ve dvou krocích. V prvním kroku vznikají nezávisle na sobě dvě částice – pre-VLDL a tuková kapénka. Pro první krok je nezbytný apolipoprotein B-100 a mikrozomální protein přenášející triglyceridy (MTP). Ve druhém kroku pak fúzuje pre-VLDL s tukovou kapénkou. Pro tento krok je nezbytný ADP-ribosylační faktor 1 (ARF1) a fosfolipáza D (PLD). Syntéza VLDL je také regulována množstvím dostupných lipidů a hladinou inzulínu. Svou úlohu mají i apolipoprotein E, apolipoprotein A-V a acyl-koenzym A:cholesterol acyl transferáza 2 (ACAT2).

V poslední části práce jsou popisovány genetické defekty syntézy a sekrece VLDL - familiární hypobetalipoproteinémie (FHBL) a abetalipoproteinémie (ABL). Diskutována je dysregulace syntézy VLDL ve vztahu k inzulínové rezistenci a diabetu II. typu.

Klíčová slova:

lipoprotein velmi nízké hustoty (VLDL), apolipoprotein B-100, mikrozomální protein přenášející triglyceridy, ADP-ribosylační faktor 1, fosfolipáza D, acyl-koenzym A:cholesterol acyl transferáza 2, familiární hypobetalipoproteinémie, abetalipoproteinémie, diabetes II. typu

ABSTRACT

The aim of this thesis is to summarize current knowledge about VLDL (very low density lipoprotein) assembly.

In the first part of this thesis basic characteristics of lipids and lipoproteins are described. Lipids are the most favourable source of energy for animals. Lipoproteins are the macromolecular complexes that transport hydrophobic lipids in plasma. According to their density, they are classified to five groups: chylomicrons, VLDL, IDL, LDL, HDL.

Second part of this thesis is focused on the apolipoproteins - structural peptide components of lipoproteins. The characteristics and functions of major apolipoprotein classes are explained with the main focus on apolipoproteins B that have an important role in VLDL assembly.

The process of VLDL assembly is described in detail in the third part of the thesis. VLDL assembly consists of two steps. Pre-VLDL and lipid droplet are synthesized independently in the first step, for which apolipoprotein B-100 and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) are essential. Second step is the fusion of pre-VLDL with the lipid droplet. ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and phospholipase D (PLD) are the essential components in the second step. Also apolipoprotein E, apolipoprotein A-V and acyl-coenzyme A:cholesterol acyl transferase 2 (ACAT2) are important. VLDL assembly is regulated by the amount of lipids and the level of insulin in plasma.

In the last part of this thesis genetic defects of VLDL synthesis and secretion are described – familial hypobetalipoproteinemia (FHBL) and abetalipoproteinemia (ABL). The dysregulation of VLDL assembly and its connection to insulin resistance and diabetes mellitus II. type are also discussed here.

Keywords:

very low density lipoprotein (VLDL), apolipoprotein B-100, microsomal triglycerid transfer protein, ADP-ribosylation factor 1, phospholipase D, acyl-coenzyme A:cholesterol acyl transferase 2, familial hypobetalipoproteinemia, abetalipoproteinemia, diabetes II. type

OBSAH

1. ÚVOD.....	3
2. LIPIDY A LIPOPROTEINY.....	4
2.1. Lipidy.....	4
2.1.1. <u>Mastné kyseliny</u>	4
2.1.2. <u>Triglyceridy</u>	4
2.1.3. <u>Cholesterol</u>	4
2.2. Lipoproteiny.....	5
2.2.1. <u>Chylomikrony</u>	5
2.2.2. <u>VLDL</u>	6
2.2.3. <u>IDL</u>	7
2.2.4. <u>LDL</u>	7
2.2.5. <u>HDL</u>	8
3. Apolipoproteiny.....	9
3.1. Apolipoproteiny A.....	10
3.1.1. <u>Apolipoprotein A-I</u>	10
3.1.2. <u>Apolipoprotein A-II</u>	11
3.1.3. <u>Apolipoprotein A-IV</u>	11
3.1.4. <u>Apolipoprotein A-V</u>	11
3.2. Apolipoproteiny B.....	12
3.2.1. <u>Apolipoproteiny B – nomenklatura</u>	12
3.2.2. <u>Hlavní rozdíly mezi apo B-100 a apo B-48</u>	13
3.3. Apolipoproteiny C.....	13
3.4. Apolipoprotein E.....	14
4. SYNTÉZAVLDL.....	15
4.1. První krok syntézy částic VLDL.....	15

4.1.1. <u>Syntéza pre-VLDL</u>	15
4.1.1.1. <i>Apolipoprotein B-100</i>	15
4.1.1.2. <i>MTP</i>	16
4.1.1.3. <i>Interakce MTP a apo B-100</i>	17
4.1.2. <u>Vznik tukové kapénky</u>	18
4.2. Druhý krok syntézy částic VLDL	21
4.2.1. <u>ATP-ribosylační faktor 1</u>	21
4.2.2. <u>Fosfolipáza D</u>	22
4.2.3. <u>Fúze pre-VLDL s tukovou kapénkou</u>	22
4.3. Hlavní faktory ovlivňující syntézu VLDL	24
4.3.1. <u>Dostupnost lipidů</u>	24
4.3.2. <u>Inzulín a jeho role v syntéze VLDL</u>	24
4.3.3. <u>Role apolipoproteinu E a apolipoproteinu A-V</u>	26
4.3.4. <u>Role ACAT2</u>	26
5. SYNTÉZA VLDL A ONEMOCNĚNÍ	27
5.1. Vzácné genetické poruchy syntézy VLDL	27
5.1.1. <u>Familiární hypobetalipoproteinémie</u>	27
5.1.2. <u>Abetalipoproteinémie</u>	28
5.2. Vztah k inzulínové rezistenci	29
6. ZÁVĚR	30
SEZNAM ZKRATEK	31
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	33

1. ÚVOD

Zvýšená koncentrace triglyceridů (TG) v plazmě je v současné době považována za významný rizikový faktor pro kardiovaskulární onemocnění. Triglyceridy jsou v cirkulaci transportovány lipoproteiny, triglyceridy syntetizované v játrech pak lipoproteiny velmi nízké hustoty (VLDL). Koncentrace VLDL v cirkulaci je určována rychlostí jejich katabolismu v cirkulaci a rychlostí jejich syntézy v játrech.

U pacientů s diabetem II. typu je syntéza a sekrece VLDL abnormálně zvýšena a zvyšuje tak riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Detailní porozumění procesům syntézy a sekrece VLDL tedy může v budoucnu přispět k pochopení patogeneze diabetu II. typu a inzulínové rezistence a tedy i k lepší prevenci a účinnější léčbě těchto tzv. civilizačních chorob.

Cíle práce:

Cílem této práce je shrnout současné poznatky o syntéze VLDL a charakterizovat geneticky podmíněné defekty syntézy VLDL a patogenezi dysregulace syntézy VLDL u diabetiků II. typu.

2. LIPIDY A LIPOPROTEINY

2.1. Lipidy

2.1.1. Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhým uhlíkatým řetězcem. Většinou se vyskytují v esterifikované podobě jako majoritní složky složitějších lipidů. Můžeme je dělit na nasycené, mononenasyčené a polynenasycené. Nejběžnější mastné kyseliny mají 16 či 18 uhlíkových atomů (palmitová 16:0, olejová 18:1, linolová 18:2 a stearová 18:0 kyselina) (3).

2.1.2. Triglyceridy

Triglyceridy, nebo také triacylglyceroly či neutrální tuky, tvoří hlavní zásobu energie u živočichů. Jsou tudíž nejčastějšími lipidy v organismech, přestože nejsou součástí biomembrán. Skládají se z triesterů glycerolu a mastných kyselin (např. palmitové či stearové). Lze je dělit na jednoduché triglyceridy, obsahující jeden druh mastné kyseliny, po kterém jsou pojmenovány, a na složené triglyceridy, které obsahují dva až tři různé zbytky mastných kyselin. Složené triglyceridy se vyskytují častěji. Metabolicky jsou oxidovány na CO_2 a H_2O . Protože jsou nepolární a hydrofobní, jsou skladovány v nevodném prostředí, tedy například uvnitř tukových kapének nebo v jádrech lipoproteinů (3).

2.1.3. Cholesterol

Cholesterol je nejběžnější molekula se steroidním jádrem a jednou hydroxylovou skupinou, díky které má amfipatický charakter. Vzhledem k přítomnosti $-\text{OH}$ skupiny je klasifikován jako sterol. Patří mezi esenciální součásti buněčných membrán živočichů, hraje roli v jejich permeabilitě a fluiditě. Je také nezbytný pro tvorbu některých hormonů, vitamínu D a žlučových kyselin (3).

2.2. Lipoproteiny

Plazmatické lipoproteiny představují ve vodě rozpustné komplexy sestavené z lipidů a jednoho či více specifických proteinů, označovaných jako apolipoproteiny. Funkcí lipoproteinů je transportovat krví hydrofobní lipidové molekuly, které nejsou rozpustné ve vodě (4). S výjimkou volného cholesterolu jsou lipidy v lipoproteinech vždy komplexní; zahrnují cholesteryl estery (CE), triglyceridy (TG) a fosfolipidy. Lipidy vyskytující se v lipoproteinech také můžeme dělit na lipidy hydrofobní (nacházející se v jádře, aby nebyly v kontaktu s vodným prostředím) mezi něž patří triglyceridy a cholesteryl estery a lipidy amfipatické, kam řadíme fosfolipidy a volný cholesterol. Lipoproteiny jsou klasifikovány dle jejich hustoty, velikosti a mobility v elektroforéze do pěti hlavních skupin: chylomikrony, VLDL, IDL, LDL, HDL (seřazeno dle zvyšující se hustoty částic). Jejich hustota záleží na hmotnostním poměru lipidů a proteinů, je tedy někde mezi hustotou lipidů (0,9 g/ml) a proteinů (>1,28 g/ml), přičemž čím méně lipidů a více proteinů, tím má částice vyšší hustotu. HDL má tento poměr zhruba 1:1 a je tedy lipoproteinem s nejvyšší hustotou, naproti tomu VLDL částice mají poměr lipidů k proteinům 9:1 (5). Lipoproteiny se skládají z jádra (*core*), které obsahuje hydrofobní TG a CE, a obalu (*surface*), který je tvořen monovrstvou amfipatických fosfolipidů, neesterifikovaným cholesterolem a apolipoproteiny. Složení jádra a obalu se značně odlišuje mezi jednotlivými typy lipoproteinů a určuje jejich typické vlastnosti a metabolické funkce.

2.2.1. Chylomikrony

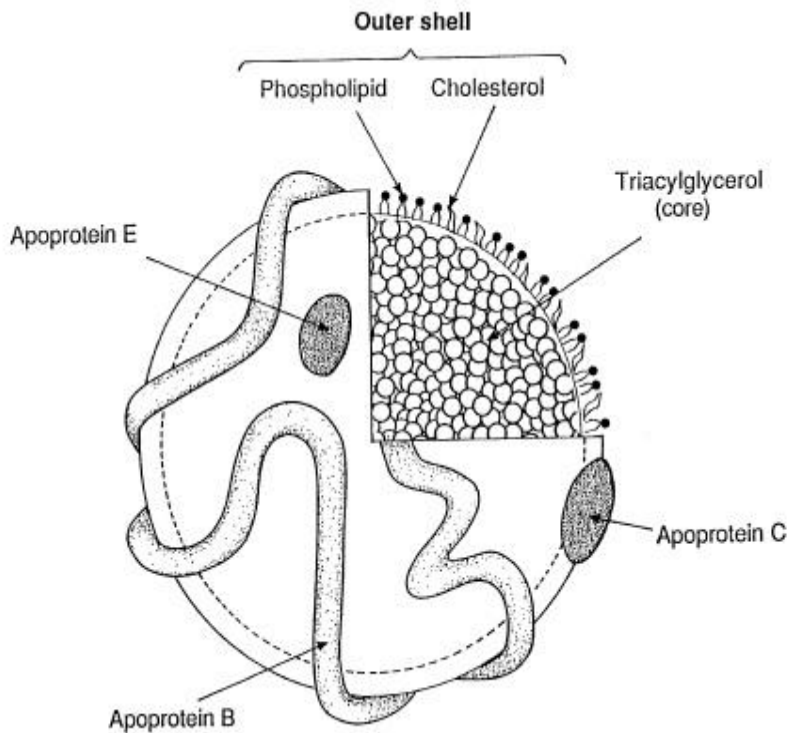
Chylomikrony jsou největšími lipoproteiny. Jsou formovány v tenkém střevě a jejich primární funkcí je transport triglyceridů a cholesterolu z potravy. Tyto látky transportují z místa absorpce v epitelu tenkého střeva k mnoha různým buňkám v těle. Jejich poměr lipidů k proteinům je 100:1, jsou tedy částicemi s nejnižší hustotou, která se blíží hustotě lipidů.

TG chylomikronů jsou v cirkulaci štěpeny působením enzymu lipoproteinové lipázy (LPL), uvolněné mastné kyseliny vstupují do tkání, kde jsou buď přímo oxidovány, nebo uloženy pro pozdější využití. Z chylomikronů takto vznikají tzv.

chylomikronové remnanty, obohacené cholesterolem. Chylomikronové remnanty jsou z cirkulace rychle odstraněny játry (4).

2.2.2. VLDL

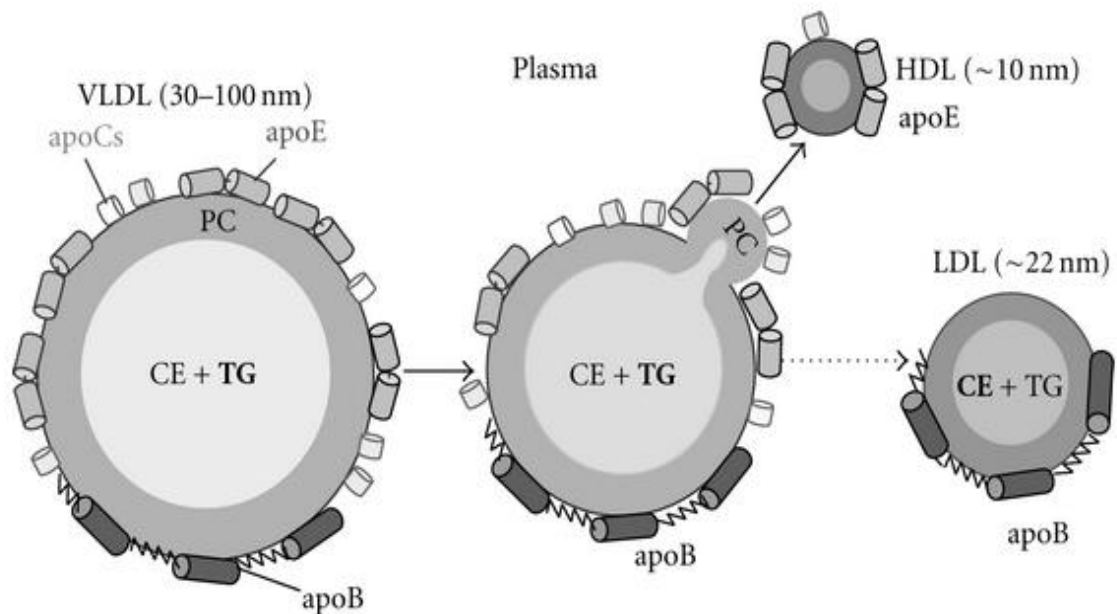
VLDL jsou syntetizovány v játrech ve dvou krocích, které jsou blíže popsány níže. Transportují většinu triglyceridů syntetizovaných v játrech. VLDL obsahují 90-92 % lipidů a 8-10 % proteinů, jejich hmotnostní poměr lipidů k proteinům je tedy 9:1. Struktura VLDL částice je vyobrazena na obrázku 1. VLDL jsou lipoproteinovou lipázou (LPL), která hydrolyzuje většinu jejich TG, přeměněny na IDL, metabolickou přeměnu VLDL popisuje obrázek 2.



Obrázek 1: Struktura VLDL

Vysvětlivky: outer shell (obal), core (jádro)

Převzato z článku (1)



Obrázek 2: Metabolická přeměna VLDL

Zralé VLDL částice transportují ve svém jádře nepolární lipidy, především TG a menší množství cholesteryl esterů. Polární povrch je tvořen fosfatidylcholinem (PC), neesterifikovaným cholesterolem a apolipoproteiny (apo C, apo E a apo B). Apo E a apolipoproteiny C, které mohou přecházet mezi lipoproteiny, jsou složeny z amfipatických α -helixů. Apo B, který zůstává vázán na lipoprotein, obsahuje domény s převládajícími α -helikálními strukturami nebo strukturami β skládaného listu. VLDL remodelování *in vivo* začíná hydrolýzou TG pomocí LPL; při hydrolýze uvolněné povrchové složky se přesouvají na HDL částice. Každá LDL částice obsahuje pouze jednu molekulu apo B.

Převzato z článku (2)

2.2.3. IDL

Částice IDL se nachází v plazmě pouze ve velmi malých koncentracích a jsou produktem metabolismu VLDL, vznikají tedy z částic VLDL působením LPL. IDL jsou degradovány v játrech nebo jsou dále přeměněny na LDL působením jaterní lipázy (HTGL).

2.2.4. LDL

Částice LDL představují konečný produkt katabolismu VLDL, přičemž vznikají z IDL působením jaterní lipázy (4). Transportují většinu cholesterolu v krvi. Jejich hmotnostní poměr lipidů k proteinům je 4:1, obsahují tedy 80 % lipidů a 20 % proteinů. Z cirkulace jsou vycytávány pomocí LDL receptoru (LDL-R), jehož ligandem je apo B a apo E. Následně jsou směřovány k degradaci

v lysozomech. Zhruba dvě třetiny jsou vycytány játry, jedna třetina pak jinými tkáněmi.

2.2.5. HDL

HDL partikule vznikají z několika zdrojů, zahrnujících i játra a střevo. Jsou také nejmenšími lipoproteiny (8-12 nm v průměru). HDL částice mají úlohu v reverzním transportu cholesterolu, kdy získávají cholesterol v periferních tkáních a transportují ho přímou nebo nepřímou cestou do jater pro exkreci (4). Jsou také, díky svému hmotnostnímu poměru lipidů k proteinům (1:1), lipoproteiny s nejvyšší hustotou.

3. APOLIPOPROTEINY

Apolipoproteiny, nebo také apoproteiny, jsou speciální skupinou proteinů. Označují se velkými písmeny a římskými číslicemi, písmena byla použita proto, že apolipoproteiny tvoří určité skupiny (tzv. rodiny). Ačkoli tyto představy jsou již překonány, označení zůstává. Římské číslice u apolipoproteinů C potom pouze poukazují na pořadí, ve kterém byly objeveny ve frakci při izolaci na chromatografické koloně (5). Apolipoproteiny stabilizují micelární strukturu lipoproteinů a spolu s fosfolipidy a neesterifikovaným cholesterolem tvoří hydrofilní povrch (obal) různých skupin lipoproteinů. Apolipoproteiny regulují metabolismus lipoproteinů a také určují jejich specifické role v metabolismu lipidů. Mezi jejich funkce patří:

- a) transportovat a redistribuovat lipidy mezi tkáněmi
- b) fungovat jako kofaktory enzymů pro metabolismus lipidů
- c) udržovat a stabilizovat strukturu lipoproteinů
- d) podílet se na syntéze některých lipoproteinů
- e) fungovat jako ligandy specifických receptorů (např. LDL-R)

Mezi apolipoproteiny se řadí: apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo A-V, apo B (apo B-48 a apo B-100), apo C-I, apo C-II, apo C-III a apo E (4). Charakteristiky základních apolipoproteinů jsou uvedeny v tabulce 1.

Apolipoprotein	Molekulární hmotnost (kDa)	Počet aminokyselin	Koncentrace v plazmě	Místo syntézy
A-I	28	243	1,2-1,6 g/l	střevo, játra
A-II	8,5	77	0,25-0,55 g/l	játra, střevo
A-IV	46	≈ 390	≈ 0,16 g/l	játra, střevo
A-V	39	368	0,1-0,4 μg/l	játra
B-48	264	2152	≈ < 0,012 g/l („na lačno“)	střevo
B-100	550	4560	< 1,2 g/l	játra
C-I	6,3	57	0,03-0,11 g/l	játra
C-II	8,9	78	0,01-0,07 g/l	játra
C-III	8,8	79	0,05-0,20g/l	játra
E	34	299	0,02-0,06 g/l	játra, střevo, mozek, ledviny, slinivka a další

Tabulka 1: Základní charakteristiky nejvýznamnějších apolipoproteinů
Upraveno podle: (6), (7), (8), (9), (10)

3.1. Apolipoproteiny A

3.1.1. Apolipoprotein A-I

Lidský apo A-I se v plazmě nachází především jako součást částic HDL. Je také přítomný v chylomikronech, pouze vzácně ho můžeme najít v chylomikronových remnantech, VLDL, IDL nebo LDL. Apolipoproteiny A-I syntetizované ve střevě vstupují do cirkulace asociovány s chylomikrony, ale jsou rychle přemístěny do HDL částic v průběhu hydrolýzy chylomikronů lipoproteinovou lipázou. O apo A-I není dosud známo, že by procházel jakýmkoli post-translačními modifikacemi jako je glykosylace, fosforylace aj. Apo A-I je jednoduchým polypeptidem. Jeho poločas života v plazmě je okolo 4 dnů. Má funkci v reverzním transportu cholesterolu, kde je ligandem transportérů ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*) a ABCG1 (*ATP-binding cassette G1*). Tyto přenašeče

participují v transportu cholesterolu a fosfolipidů na částice HDL. Apo A-I je také aktivátorem lecithin-cholesterol acyltransferázy (LCAT), což je serinová hydroláza katalyzující reakci, kdy se na částicích HDL z volného cholesterolu a fosfatidylcholinu syntetizuje ester cholesterolu a lysofosfatidylcholin (4).

3.1.2. Apolipoprotein A-II

Apo A-II se vyskytuje jako homodimer. Dominantním místem syntézy jsou játra. Je po apo A-I druhým nejčastějším proteinem v HDL (tvoří zhruba 20 % objemu všech proteinů v HDL) (6). Lidský apo A-II může existovat také jako smíšený dimer s apo E (disulfidická vazba) (4).

Experimenty na transgenních myších prokázaly spojitost obezity a inzulínové rezistence (diabetu II. typu) s apo A-II (6). Nicméně funkce apo A-II není zatím zcela jasně definována.

3.1.3. Apolipoprotein A-IV

Apolipoprotein A-IV patří mezi glykoproteiny (6). Místo syntézy je dominantně v játrech. Je komponentou nově syntetizovaných chylomikronů (4). Podílí se na syntéze chylomikronů a také na absorpci tuků ve střevě (6). V chylomikronových remnantech, VLDL ani LDL není obsažen ve významném množství. V lidských HDL je apo A-IV menšinovou proteinovou složkou, u potkanů je jednou z hlavních složek.

Na rozdíl od většiny apolipoproteinů není převážná část apo A-IV vázána na lipoprotein (4).

3.1.4. Apolipoprotein A-V

Apo A-V byl poprvé popsán v roce 2001 a dostal své jméno na základě homologie s apo A-IV (11). Gen *APOA5* je exprimovaný pouze v játrech. Koncentrace apo A-V v plasmě je u lidí ve srovnání s jinými apolipoproteiny nízká (12). Apo A-V je velmi důležitý pro metabolismus TG. Urychluje hydrolýzu chylomikronů a VLDL, a to přímou modulací aktivity LPL. Může mít také roli v syntéze VLDL, jak bude popsáno níže. Dále apo A-V funguje jako ligand pro

lipoproteinové receptory a proteoglykany, čímž podporuje receptorem zprostředkovanou endocytózu lipoproteinů (13).

3.2. Apolipoproteiny B

Apolipoprotein B má zřejmě klíčovou roli v udržování homeostázy TG a cholesterolu v buňkách a také v patogenezi aterosklerózy (14). Primárně existuje ve dvou formách, apo B-100 a apo B-48. U lidí je apo B-100 syntetizován v játrech, apo B-48 ve střevě. U potkana a některých dalších živočišných druhů je apo B-48 syntetizován nejen ve střevu, ale i v játrech (4). Apo B patří mezi glykoproteiny a je nutný při formování chylomikronů (apo B-48) a VLDL (apo B-100).

Oba apolipoproteiny jsou syntetizované v drsném ER a obsahují 24 aminokyselin dlouhý signální peptid (14).

Vzhledem k úloze apo B-100 v syntéze VLDL a chylomikronů bude detailní popis jeho funkce v kapitole 4 této práce.

3.2.1. Apolipoproteiny B – nomenklatura

Nomenklatura apo B byla navržena v době, kdy nebyla známa sekvence proteinu ani genu, a ani nebylo možné přesně určit molekulární hmotnost. Apolipoproteinu B s nejvyšší hodnotou molekulární hmotnosti byla přiřazena číslice 100 a názvy dalších variant apo B se pak odvíjely od této hodnoty na principu setinového systému (procentuálního). Hlavní proteinová složka VLDL byla nazvána apo B-100, hlavní proteinová komponenta chylomikronů apo B-48 (15). Autoři tohoto článku ještě pojmenovali další dvě varianty apo B, a to apo B-26 a apo B-74. V současné době je známo, že tyto dvě varianty jsou produktem štěpení apo B-100 *in vitro*.

3.2.2. Hlavní rozdíly mezi apo B-100 a apo B-48

Pro apolipoprotein B-100 i B-48 je v játrech i střevě přítomna stejná mRNA, jsou tedy kódovány stejným genem (16). Rozdíl mezi apo B-100 a apo B-48 je dán editací mRNA, která je katalyzována RNA specifickou cytidindeaminázou – Apobec 1 (*apolipoprotein B editing complex*). Pro funkci enzymu je nezbytná přítomnost dalšího proteinového kofaktoru (17). Tento enzym katalyzuje záměnu C za U v kodónu 6666 CAA kódujícím Gln²¹³⁵ v mRNA apolipoproteinu B. Takto vznikne předčasný stop kodón UAA (18). K editaci mRNA dochází u člověka pouze ve střevě.

Játra lidského fétu i adultního jedince syntetizují pouze apo B-100, na rozdíl od jater potkana, které syntetizují i apo B-48. Nicméně situace je o něco komplikovanější v raném období vývoje plodu, kdy je dominantně syntetizovaným apolipoproteinem ve střevu apo B-100, s postupným vývojem začíná převládat syntéza apo B-48. U dospělých jedinců se ve střevě syntetizuje jenom apo B-48 (16). Mechanismus generující předčasný stop kodón v mRNA apolipoproteinu B v enterocytu musí tedy být ontogeneticky regulovaný (18).

Další zásadní rozdíl mezi oběma apolipoproteiny B spočívá v tom, že v C-terminální doméně apo B-100 je lokalizována doména interagující s LDL receptorem (LDL-R). V apo B-48 tato doména chybí a apo B-48 tak nemůže s LDL-R interagovat (5).

3.3. **Apolipoproteiny C**

Apolipoproteiny C patří mezi nejmenší známé apolipoproteiny. Apo C-I, apo C-II i apo C-III jsou složkou povrchu chylomikronů, VLDL a HDL. V období, kdy není přijímána potrava, jsou asociovány především s HDL, ale po vstupu chylomikronů a VLDL do cirkulace jsou redistribuovány na jejich povrch. Převažujícím místem syntézy jsou játra, ve střevě je pak syntetizována pouze menšina apo C (4). Apo C-I je aktivátorem LCAT, apo C-II aktivuje LPL, apo C-III naopak aktivitu LPL inhibuje (7).

3.4. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E je proteinovou složkou chylomikronů a jejich remnantů, VLDL a HDL částic obsahujících apo E (4). U VLDL částic tvoří 13 % z celkového obsahu proteinů. Je to polypeptid složený z 299 aminokyselin, přičemž nejčastěji zastoupenou aminokyselinou je arginin, který zaujímá 10 % z celkového počtu aminokyselin (7). Apo E má mnoho různých funkcí, mezi něž patří: role v transportu a metabolismu cholesterolu, receptorem zprostředkované vychytávání specifických lipoproteinů (je ligandem pro LDL-R a také pro remnantní receptor (LRP)), vazba heparan sulfátu, formování částic bohatých na CE. Výzkumy poukazují i na jeho roli v regulaci syntézy VLDL (4).

4. SYNTÉZA VLDL

Syntéza částic VLDL (*VLDL assembly*) zahrnuje dva kroky. V prvním se spontánně formují dva na sobě nezávislé prekurzory a to, částice pre-VLDL obsahující apolipoprotein B a tukové kapénky o velikosti VLDL. V druhém kroku pak tyto částice fúzí a vytvoří zralou částici VLDL (19, 20).

4.1. První krok syntézy částic VLDL

4.1.1. Syntéza pre-VLDL

Syntéza pre-VLDL probíhá v ER a je pro ni nezbytný apo B-100 a mikrozomální protein přenášející TG (MTP, *microsomal triglyceride transfer protein*). MTP zprostředkovává lipidaci apo B-100, čímž ho chrání před degradací.

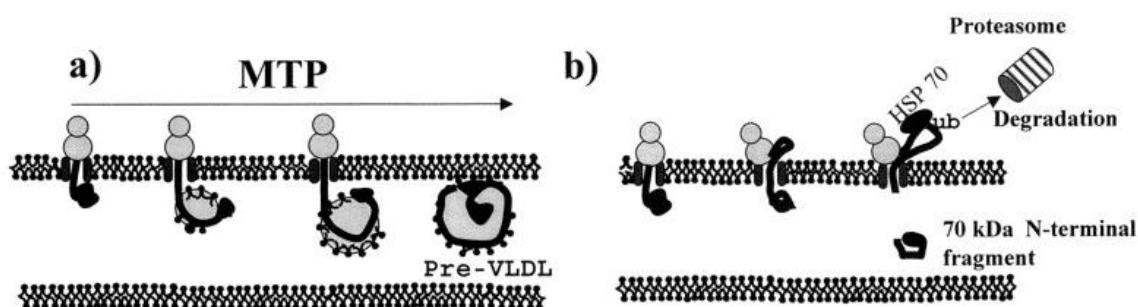
4.1.1.1. *Apolipoprotein B-100*

Apo B-100 je velký amfipatický protein, naprosto nezbytný pro syntézu VLDL (21). Apo B-100 neobsahuje žádné sekvence typické pro membránově vázané proteiny a není typicky membránově vázaným proteinem (22). Na rozdíl od jiných apolipoproteinů funguje jako stálá proteinová komponenta lipoproteinů (23), přičemž každá částice lipoproteinu obsahuje pouze jednu molekulu apo B (24). Je syntetizován, jakožto i jiné sekretorické proteiny, na ribozomech drsného ER. Transkripce genu pro apolipoprotein B je konstitutivní. Jeho syntéza je regulována posttranslačně (21).

V prvním kroku syntézy VLDL je apo B-100 kotranslačně a posttranslačně lipidováno za pomoci MTP a vzniká tak částice označovaná jako pre-VLDL. Částice pre-VLDL je asociována s membránou ER, nicméně mnohem volněji než integrální membránové proteiny, viz obrázek 3a. Z této membránově vázané formy je částice pre-VLDL uvolňována do lumen ER se zpožděním 10-15 minut (22).

Pokud nedojde k dostatečné lipidaci nebo MTP není vůbec přítomno, apo B-100 se degraduje. V takovém případě apo B-100 nejprve interaguje s HSP70 (*heat shock protein 70*), poté je ubiquitinován a následně degradován v proteazomech. Aby se apo B-100 dostal do cytosolu, je přesunut translokačním kanálem. Tento

proces nezahrnuje N-terminální doménu apo B, která je před degradací apo B v proteozomu odštěpena. Viz obrázek 3b (25).



Obrázek 3: Syntéza pre-VLDL a mechanismus degradace apo B

Vysvětlivky: protein teplotního šoku (*HSP70, heatshock protein 70*); ubikvitin (*ub*); 70 kDa N-terminální fragment apolipoproteinu B (*70kDa N-terminal fragment*)

Upraveno dle článku (25)

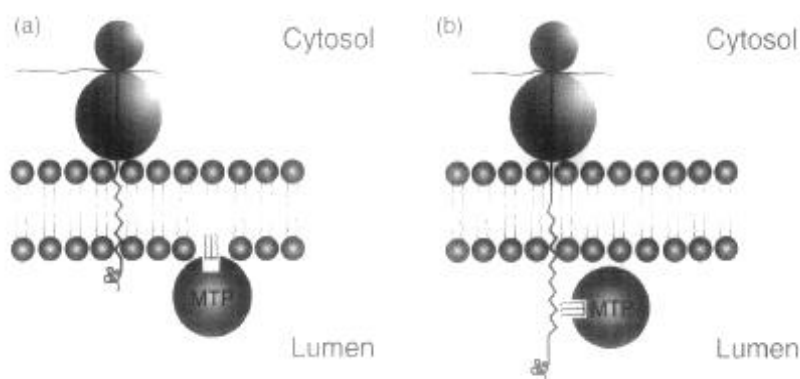
4.1.1.2. MTP

MTP je intracelulárním proteinem vyměňujícím lipidy, který preferenčně transportuje triglyceridy a cholesteryl estery z tukových kapének na vznikající částice pre-VLDL. Je nezbytný pro produkci VLDL a chylomikronů v játrech a střevu. Nachází se pouze v lumen ER, izolovaných z jater a střeva. MTP je homologní s vitellogeninem, který se u vejcorodých živočichů využívá pro formování zásobních lipoproteinů. MTP se skládá ze dvou podjednotek o molekulární hmotnosti 55 kDa a 97 kDa, je tedy heterodimerem (26). Malá podjednotka je multifunkčním enzymem – protein disulfid izomerázou (PDI). Při asociaci PDI s velkou podjednotkou MTP drasticky poklesne exprese aktivity disulfid izomerázy. Pokud je komplex malé a velké podjednotky rozrušen pomocí guanidinHCl, ztrácí schopnost přenášet lipidy, ale disulfid izomerázová aktivita se zvýší na úroveň srovnatelnou s nativní PDI (27).

4.1.1.3. Interakce MTP a apo B-100

Pro lipidaci apo B-100 je nezbytná jeho interakce s MTP. Za vysoce afinitní interakci apo B s MTP zodpovídá velká 97 kDa podjednotka MTP. Zkoumání vlivu různých koncentrací solí na interakci apo B s MTP, ukázalo, že počáteční protein-protein interakce jsou ionické, následné interakce těchto dvou proteinů jsou hydrofobní.

18 % N-terminální části apo B-100 obsahuje sedm z osmi disulfidických můstků celkem přítomných v apo B-100. Tyto disulfidické můstky jsou dostatečné a zároveň nezbytné pro vazbu MTP k apo B-100. K interakci mezi oběma proteiny dochází poté, kdy je prvních 70-85 kDa nově syntetizovaného apolipoproteinu B přemístěno do lumen drsného ER (obrázek 4a). Následující domény apo B obsahují amfipatické struktury β -skládaného listu a α -helixy, které mohou vázat nepolární lipidy. Přesun lipidů zprostředkovaný MTP k těmto doménám zajistí správné přemístění a sbalení (*foldi*ng) apo B (obrázek 4b). Po té co je translace a translokace ukončena, vznikající malá denzní lipoproteinová částice je uvolněna do lumen ER (26).



Obrázek 4: Model role MTP v syntéze lipoproteinů
Upraveno dle článku (26)

Jak se prodlužuje apo B-100 a zvyšuje se jeho lipidace, klesá síla interakce s MTP (28). Autoři tohoto článku spekulují, že slabší interakce může být dána zpomalenou lipidací delšího polypeptidu nebo tento delší polypeptid obsahuje oblasti, které mají na vazbu negativní vliv (28).

To, že interakce apo B-100 s MTP je pro první krok syntézy částic VLDL nezbytná prokázaly také experimenty, kdy byl k přímému sledování vlivu aktivity MTP na buněčné úrovni využit selektivní inhibitor MTP, a to BMS-192951. BMS-192951 po expozici UV světlem inhibuje přenos TG zprostředkovaný MTP. Výsledky experimentu ukázaly, že se sekrece apo B snížila proporcionálně vzhledem k poklesu aktivity MTP a to ve všech třech použitých buněčných systémech (HepG2 buňky, McArdle RH-7777 potkaní jaterní buňky a primární potkaní hepatocyty) (29).

Expresí MTP spolu s apo B v prostředí s dostatečným množstvím využitelných lipidů je k dokončení prvního kroku syntézy VLDL nezbytná. Naproti tomu inaktivace MTP po dokončení prvního kroku syntézy VLDL nemá na druhý krok jejich syntézy žádný vliv, MTP tedy není vyžadováno pro fúzi VLDL prekurzoru obsahujícího apo B s tukovou kapénkou (20).

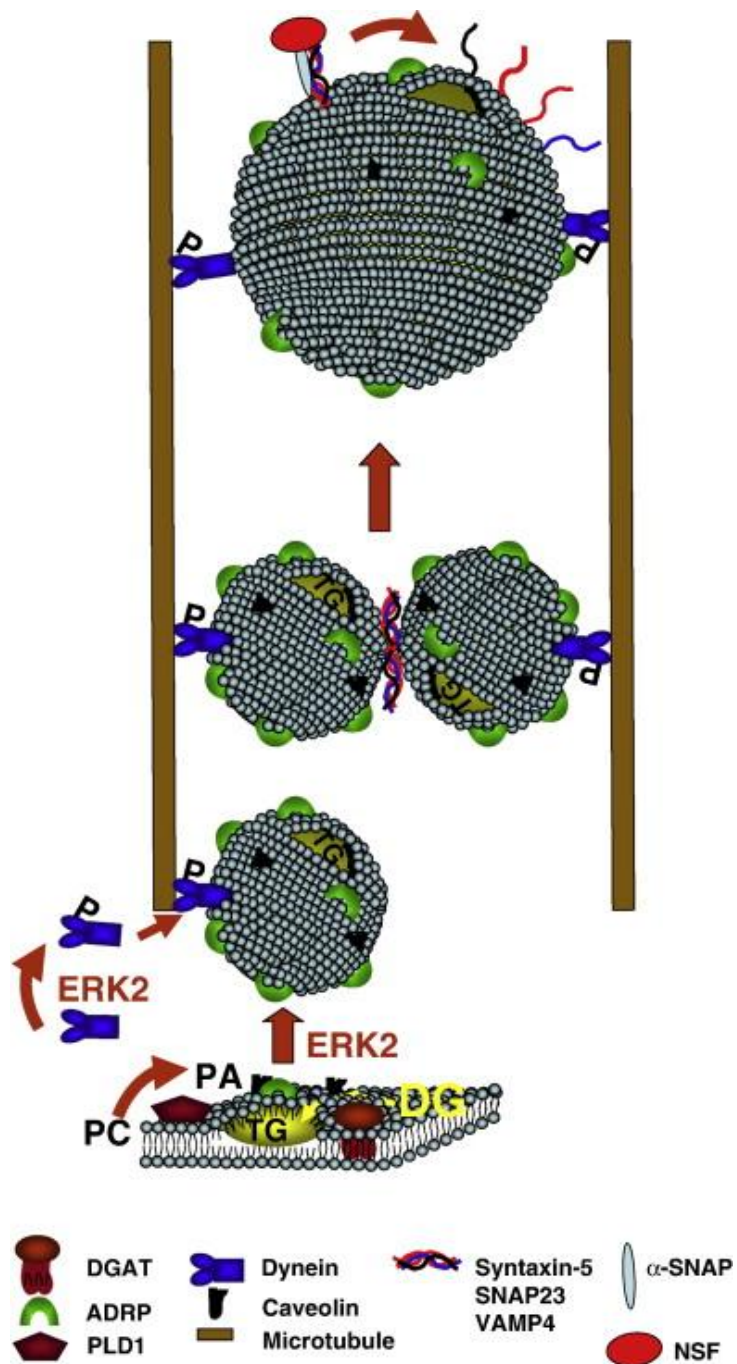
4.1.2. Vznik tukové kapénky

Tukové kapénky se nachází v cytosolu, mají jádro složené z neutrálních tuků a jejich povrch je tvořen monovrstvou amfipatických lipidů (fosfolipidů a cholesterolu) a proteinů. Tukové kapénky jsou dynamické orgány, které mohou své rozměry zvětšit fúzí (30). Formování tukové kapénky je nezávislé na syntéze apolipoproteinu B-100 a nemá na ni vliv (31).

Při procesu syntézy tukové kapénky jsou diglyceridy (DG) konvertovány v mikrozomální membráně na triglyceridy (TG) pomocí enzymu diacylglycerol acyltransferázy (DGAT). Zabudováním TG mezi dva listy této membrány se formuje jádro tukové kapénky. Syntéza tukové kapénky vyžaduje produkci fosfatidové kyseliny (PA) z fosfatidylcholinu (PC), tato reakce je katalyzována fosfolipázou D (PLD). V procesu syntézy tukové kapénky je nejprve vytvořena malá primární tuková kapénka s poloměrem menším než 0,5 μm . Pro syntézu tukové kapénky je také vyžadována proteinkináza ERK2, která fosforyluje

protein dynein, který se potom váže na tukové kapénky a umožňuje jim pohybovat se po mikrotubulech. Tento mechanismus, který umožňuje transport tukových kapének v buňce na dlouhé vzdálenosti, je také nutný pro fúzi tukových kapének. Fúzi katalyzují SNARE proteiny, a to SNAP23, syntaxin-5 and VAMP4. Po proběhnutí fúze, svazek čtyř helixů formovaný SNARE doménami, tří výše zmíněných SNARE proteinů, je rozpoznán pomocí α -SNAP. Tento protein spolu s ATPázou NSF rozvine svazek a tak umožňuje zahájit novou fúzi. Formování a fúzi tukových kapének zobrazuje obrázek 5 (30).

Z uvedeného vyplývá, že formování tukové kapénky je závislé především na nabídce lipidů, aktivitě PLD a DGAT. Tuková kapénka na povrchu také obsahuje caveolin, vimentin, ADRP (*adipocyte differentiation-related protein*) a GRP-78 (*glucose-regulated protein78*). Vimentin na povrchu tukové kapénky tvoří kostru z intermediálních filament. Pro pučení tukových kapének je kritická vazba ADRP na mikrozomální membránu. ADRP je přítomen především na malých tukových kapénkách (31). Při zvýšené expresi ADRP v buňkách je stimulováno ukládání neutrálních tuků do tukových kapének a redukuje se jejich vstup do biosyntetické dráhy VLDL. Poklesne tedy produkce VLDL, a to i navzdory tomu, že obsah TG v buňkách se zvýší (30). GRP-78 je chapereonem s KDEL sekvencí, směřující tukové kapénky do ER. KDEL sekvence je signální sekvence na C-konci bílkoviny a skládá se ze čtyř aminokyselin (lysin, kyselina asparágová, kyselina glutamová, leucin) (31).



Obrázek 5: Model formování tukových kapének
Převzato z článku (30)

4.2. Druhý krok syntézy částic VLDL

V druhém kroku syntézy VLDL je ke vznikající částici přidána většina lipidů (primárně TG). Dochází k fúzi prekurzorů obsahujících apo B s tukovými kapénkami a vzniku zralé částice VLDL (20). Pozdní kroky v syntéze VLDL se odehrávají v Golgiho aparátu (32) a jsou závislé především na ARF1, PLD a dostatečném množství triglyceridů pro finální maturaci. Někteří autoři však o Golgiho aparátu, jakožto místu pozdních kroků syntézy VLDL pochybují a určují ER jako oblast, kde probíhá druhý krok syntézy VLDL (25).

4.2.1. ADP-ribosylační faktor 1

ARF1 je, podobně jako i další ADP-ribosylační faktory, guanin vázající protein o molekulární hmotnosti 20 kDa. ADP-ribosylační faktory jsou členy Ras GTPázové rodiny a proto není ARF1 při vazbě s GDP aktivní. Teprve po výměně GDP za GTP vzniká aktivní komplex ARF-GTP, který může asociovat s membránami. ARF1 hraje roli ve vezikulárním transportu a také aktivuje fosfolipázu D (33).

ARF1 je nezbytný pro formování COPII, což jsou sekretorické váčky účastnící se anterográdního transportu z ER do GA. Podílí se na výběru a transportu proteinů (především apo B) do místa, kde se odehrává druhý krok syntézy VLDL, tj. GA (34).

Funkce ARF1 může být inhibována brefeldinem A (BFA) (35). BFA je produktem metabolismu některých hub, kde je syntetizován z palmitátu (C₁₆) (36). Funkci ARF1 inhibuje tím, že zamezí výměně GDP za GTP. Pokud není tato výměna umožněna je ARF1 neaktivní (35) a pre-VLDL nemohou být dopraveny do místa syntézy druhého kroku (GA), nemohou tedy dokončit maturaci a jsou degradovány (34). Současně je inhibována i lipidace apo B-100. Inhibice brefeldinem A je reverzibilní (37).

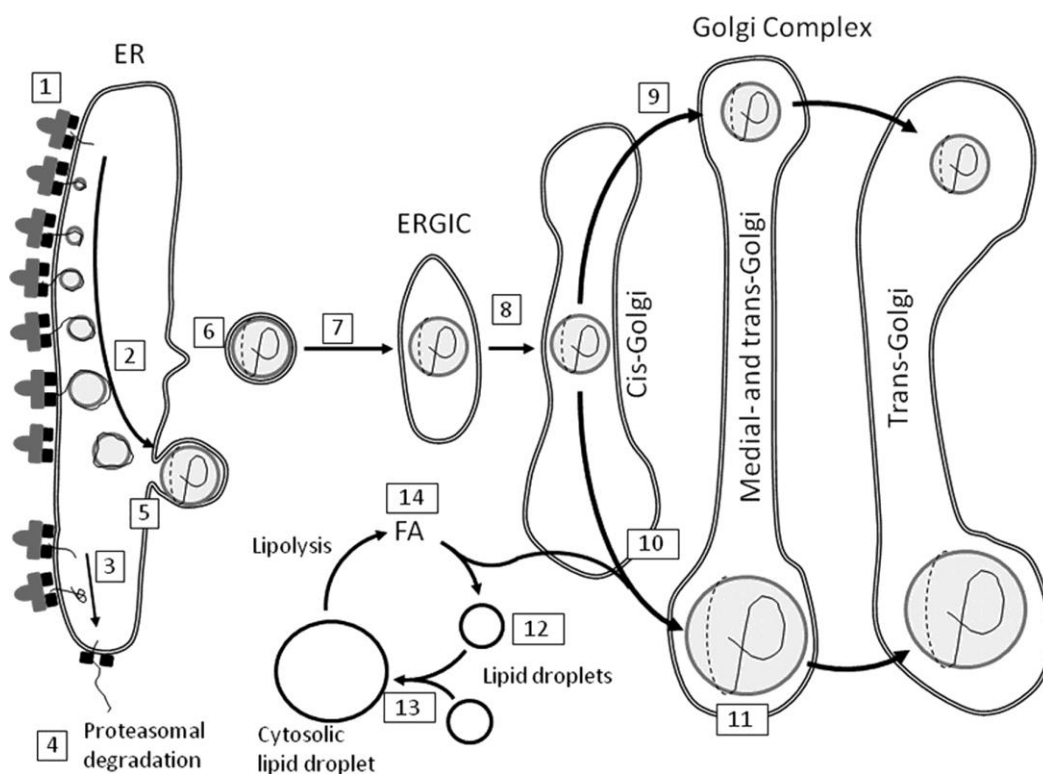
4.2.2. Fosfolipáza D

Fosfolipáza D katalyzuje konverzi fosfatidylcholinu na fosfatidovou kyselinu (PA). Z PA se může formovat diacylglycerol, což je substrát pro syntézu TG. Dostatek TG je esenciální pro syntézu VLDL (35). PLD je důležitá pro intracelulární transport. Účastní se formování tukové kapénky a podílí se na jejím uvolnění z mikrozomů. Proto při specifické inhibici PLD tukové kapénky nevznikají. Mezi regulátory aktivity PLD patří ARF1 a proteinkináza C, může se tedy účastnit i procesu pučení intracelulární membrány (31).

Její role v syntéze VLDL tedy zahrnuje poskytování substrátu (PA) pro syntézu TG a účast na uvolnění tukové kapénky z mikrozomů, která následně fúzuje s pre-VLDL.

4.2.3. Fúze pre-VLDL s tukovou kapénkou

Druhý krok začíná v okamžiku, kdy částice pre-VLDL chudá na TG uniká z ER pomocí Sar1/COPII vezikul, pučících ven ze specifických míst na membráně ER. Vezikuly fúzují a tvoří ER-Golgi intermediální kompartment (ERGIC), který následně fúzuje s cis-Golgi. Část z pre-VLDL může být transportována a sekretována sekretorickou dráhou z hepatocytu přímo, takto vznikající VLDL jsou označovány jako VLDL₂. Druhá část pre-VLDL fúzuje s tukovou kapénkou a tvoří částici VLDL bohatou na TG (označovanou jako VLDL₁). Produkce VLDL₁ je závislá na akumulaci TG v cytosolických tukových kapénkách, obrázek 6 (38).



Obrázek 6: Syntéza a sekrece apo B-100 obsahujících lipoproteinů

Apo B je syntetizováno a přeneseno do lumen ER (1). Rostoucí apo B je kotranslačně lipidováno pomocí MTP za vzniku pre-VLDL částice (2,5). Pokud apo B není lipidováno (3), je degradováno v proteazomech (4). Částice pre-VLDL uniká z ER pomocí Sar1/COPII vezikul (6). Vezikuly fúzí a tvoří ER Golgi intermediální kompartment (ERGIC) (7), který pak fúzuje s cis-Golgi (8). Takto vzniklé částice VLDL₂ jsou dále transportovány sekretorickou dráhou (9). Alternativně dochází k fúzi s tukovou kapánkou (10) za vzniku VLDL₁ (11). Tukové kapénky vznikají v mikrozomální membráně (12) a zvětšují svůj objem fúzí (13). TG tukových kapének mohou být rovněž hydrolyzovány (14).

Upraveno dle článku (38)

4.3. Hlavní faktory ovlivňující syntézu VLDL

Syntéza VLDL je ovlivňována v první řadě dostupností lipidů (mastnými kyselinami a TG), dále pak inzulínem, jakožto klíčovým regulačním faktorem pro uvolňování TG ze zásob v organismu. Určitou úlohu zřejmě mají i apo E, apo A-V a také acyl-koenzym A cholesterol acyltransferáza 2 (ACAT2).

4.3.1. Dostupnost lipidů

Zásadním faktorem důležitým pro VLDL syntézu je dostupnost mastných kyselin (FA, *fatty acids*). Tyto mastné kyseliny mohou vznikat v hepatocytech syntézou *de novo* nebo z remnantních lipoproteinů vychytených játry. Podstatná část FA je však hepatocyty vychytána z cirkulace. Tyto FA jsou uvolňovány z tukové tkáně, kde vznikají hydrolýzou skladovaných TG působením hormon senzitivní lipázy. Poté vstupují do cirkulace a jsou transportovány do jater vázány na albumin a v játrech jsou re-esterifikovány. Převážná část nově syntetizovaných TG není přímo využita v syntéze VLDL, ale je ukládána do cytosolických tukových kapének. Játra tak fungují jako pufr, který chrání periferní tkáně před potencionálně toxickým efektem nadbytku FA, a to právě tím, že FA jsou skladovány pomocí esterifikace jako TG (39).

Význam FA v syntéze VLDL potvrzují experimenty s hepatocyty v kultuře, které jsou schopny VLDL syntetizovat a sekretovat pouze v přítomnosti dostatku FA, např. kyseliny olejové (40).

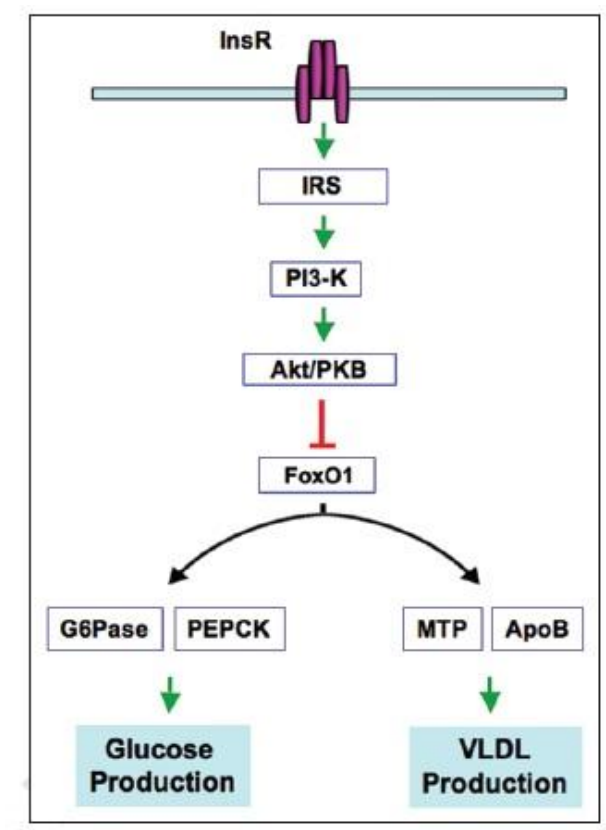
4.3.2. Inzulín a jeho role v syntéze VLDL

Inzulín je hormon, který zprostředkovává odpověď organismu na příjem živin a blokuje využití zásobních TG a tedy i distribuci TG z jater. Krátkodobý účinek inzulínu na syntézu VLDL je zprostředkován inhibicí transkripce MTP (39). To vede k tomu, že apo B není pomocí MTP lipidováno a je tudíž degradováno, syntéza VLDL je tedy zablokována (41).

Transkripční faktor FoxO1 (*forkhead box O1*) integruje inzulínovou signalizaci, která ovlivňuje produkci glukózy a částic VLDL v hepatocytu. Inzulín se váže ke svému receptoru (Insr) na povrchu buňky, což vede k aktivaci kaskády událostí zahrnující IRS (*insulin receptor substrate*), PI3-kinázu a proteinkinázu B

(Akt/PKB). Inzulín inhibuje FoxO1 aktivitu skrze fosforylaci závislou na Akt/PKB a. Fosforylovaný transkripční faktor FoxO1 disociuje z promotoru genu kódujícího MTP, je odstraněn z jádra a to vede k zablokování transkripce MTP. Tento efekt pomáhá játrům omezit produkci jaterní glukózy a VLDL-TG v postprandiální fázi. Schéma této signální dráhy je na obrázku 7.

Chronické vystavení jaterních buněk vysoké hladině inzulínu vede k vymizení citlivosti těchto buněk na regulační účinky inzulínu, pravděpodobně jakožto výsledek snížené exprese (downregulace) inzulínového receptoru (39). Ztráta inhibičního vlivu inzulínu na aktivitu FoxO1 v játrech rezistentních k inzulínu vede k nadměrné produkci glukózy i VLDL-TG (42).



Obrázek 7: Regulace exprese MTP inzulínem
Převzato z článku (42)

4.3.3. Role apolipoproteinů E a apolipoproteinů A-V

Apolipoprotein E je, spolu s apo B, ligandem pro LDL-R. Má tudíž roli v receptorem zprostředkované degradaci některých lipoproteinů (VLDL, chylomikronů a jejich remnantů). Jeho funkce v syntéze VLDL, která spočívá především v regulaci metabolismu jaterních tuků, je na této roli nezávislá. Apo E ovlivňuje sekreci VLDL-TG. U apo E deficientních myší se počet nově syntetizovaných částic VLDL nemění, nicméně částice VLDL jsou menší pravděpodobně v důsledku defektního transportu triglyceridů v průběhu druhého kroku syntézy. Pokud je u těchto myší exprimován gen pro lidský apo E, produkce VLDL se normalizuje (43). Někteří autoři jsou naopak přesvědčeni, že maturace VLDL je na apo E nezávislá (32).

Dalším apolipoproteinem, který by mohl ovlivnit syntézu VLDL, je apo A-V. Tento protein je nadměrně exprimován při regeneraci jater (44) a předpokládá se, že by mohl inhibovat syntézu a sekreci VLDL v době, kdy játra regenerují a TG využívají jako zdroje energie (45).

4.3.4. Role ACAT2

Acyl-koenzym A cholesterol acyltransferáza 2 (ACAT2) patří mezi transmembránové proteiny lokalizované v ER, přenáší zbytek mastné kyseliny z acyl-CoA na volný cholesterol, za vzniku esterů cholesterolu. CE vzniklé působením ACAT2 mohou být přímo transportovány do jádra lipoproteinů obsahujících apo B nebo mohou být uloženy v tukových kapénkách v cytosolu. Předpokládá se, že ACAT2 zprostředkovává inkorporaci CE do jádra VLDL. Limitujícím faktorem pro aktivitu ACAT2 je obsah volného cholesterolu v buňce. Aktivita ACAT2 má stimulační vliv na sekreci VLDL. (46).

5. SYNTÉZA VLDL A ONEMOCNĚNÍ

Defekty v syntéze VLDL mohou být příčinou různě závažných genetických onemocnění, jako je FHBL (familiární hypobetalipoproteinémie) a ABL (abetalipoproteinémie). Patologicky zvýšená syntéza VLDL je jedním z charakteristických rysů diabetu II. typu.

5.1. Vzácné genetické poruchy syntézy VLDL

Genetické defekty v syntéze VLDL jsou příčinou velmi vzácných dědičných chorob, pro které je charakteristická velmi nízká (či nulová) koncentrace apo B a cholesterolu vázaného na LDL a VLDL v plazmě, která se pohybuje pod úrovní pátého percentilu distribuce v populaci. Jedná se o familiární hypobetalipoproteinémii (FHBL) a abetalipoproteinémii (ABL) (47).

5.1.1. Familiární hypobetalipoproteinémie

FHBL patří mezi autozomálně dominantní onemocnění. Charakterizuje ji velmi nízká koncentrace VLDL a LDL, která je důsledkem výrazně zrychleného katabolismu těchto lipoproteinů nebo defektní syntézy VLDL. V případě zrychleného katabolismu byly popsány mutace v genech *PCSK9* (*proprotein invertase subtilisin/kexin type 9*) a *ANGPTL3* (*angiopoietin-like protein 3*). *PCSK9* zvyšuje odbourávání LDL-R v játrech a tím reguluje hladinu LDL-C. Ztráta funkce *PCSK9* tedy vede k extrémně urychlenému katabolismu VLDL a LDL, protože pacienti mají podstatně více LDL-R (48). Ztráta funkce *ANGPTL3* je spojena s výrazným urychlením katabolismu VLDL (49).

Většina pacientů s FHBL má však defekt syntézy VLDL. Bylo prokázáno, že u těchto pacientů jsou přítomny vzácné varianty apo B, vzniklé vložením předčasného stop kodónu (50).

První zkrácenou variantu apo B související s FHBL popsal v roce 1988 Collins et al., a to delecí jediného guaninového nukleotidu v leucinovém kodónu v pozici 1794. Tato delece vede k posunu čtecího rámce a velmi rychlému vzniku stop kodónu. Vznikne zkrácená forma apolipoproteinu B, v tomto případě apo B-39 (51).

V současnosti je známo více než 60 různých variant apo B, od apo B-2 až po apo B-89 (čísla odkazují na procento molekulární hmotnosti ve vztahu k apo B-100), všechny tyto zkrácené varianty jsou příčinou FHBL. Syntéza VLDL je u pacientů s těmito variantami snížena ze zatím neznámých důvodů. Apolipoproteiny B kratší než apo B-27,6 nejsou obvykle v plazmě přítomny z důvodu jejich rychlé degradace. Protože kratší formy apolipoproteinů B než je apo B-100 mají sníženou kapacitu pro export jaterních triglyceridů (je narušena syntéza VLDL částic, ke které je apo B-100 nezbytné), je jaterní tuk zvýšen až trojnásobně, což v některých případech vede k jaterní steatóze (50).

5.1.2. Abetalipoproteinémie

ABL je autozomálně recesivní nemoc, charakterizovaná takřka úplnou absencí apo B-100 obsahujících lipoproteinů v plazmě a nízkou plazmatickou koncentrací TG a cholesterolu. Tyto patologické výsledky jsou způsobeny genetickým defektem při syntéze a sekreci VLDL v játrech a chylomikronů ve střevě. ABL vede ke špatnému vstřebávání v tucích rozpustných vitamínů, což vyúsťuje například v pigmentózní retinitidu (*retinitis pigmentosa*), mozečkovou degeneraci spojenou s ataxií aj. (54).

Původně se předpokládalo, že defekt je na úrovni *APOB* genu. Teprve Blackhart et al. a Ross et al. navrhli, že ABL může být způsobena mutací nejen v genu *APOB* samotném, ale i v jiném produktu, který je nezbytný pro apo B-100. Předpokládali, že ABL je způsobena defektní sekrecí apo B (52, 53). Wetterau et al. v roce 1992 při srovnání vzorků střevní biopsie 8 kontrol a 4 pacientů s ABL zjistil, že u pacientů s ABL aktivita MTP zcela chyběla. Z toho uzavřel, že MTP je nutný pro syntézu VLDL a defekt v MTP je příčinou ABL (54). Shoulders et al. pak u jedné rodiny s ABL identifikoval splicing mutaci v genu, který kóduje velkou podjednotku MTP (55).

5.2. Vztah k inzulínové rezistenci

Inzulínová rezistence a diabetes II. typu v současném vyspělém světě představují jeden z nejpálčivějších zdravotních problémů. Na jejich patogenezi má, dle nynějších poznatků, zásadní vliv defektní regulace syntézy VLDL.

Charakteristikou inzulínové rezistence a diabetu II. typu je přítomnost malých denzních LDL, vysoké hladiny TG a nízké hladiny HDL cholesterolu. Zdá se, že výše zmíněné charakteristiky mají původ v nadprodukcí částic VLDL v játrech. Produkce VLDL je zvýšená, protože inzulínem není inhibováno uvolňování FA z tukové tkáně, která je inzulín rezistentní, a protože chybí vliv inzulínu na transkripci MTP skrze fosforylaci transkripčního faktoru FoxO1. Pacienti s diabetem II. typu tedy syntetizují více VLDL, které prošly kompletní lipidací (VLDL₁). Pacienti mají také narušenou degradaci všech produktů metabolismu VLDL (tzn. IDL a LDL) v játrech, čímž se prodlouží doba setrvání těchto lipoproteinů v plazmě, jejich plazmatická koncentrace je tedy vyšší (38).

6. ZÁVĚR

Syntéza VLDL v játrech představuje klíčový krok pro transport TG k mimojaterním tkáním. Proces vzniku částic VLDL je rozdělen do dvou kroků. Pro první krok, kde vzniká pre-VLDL a tuková kapénka, jsou naprosto nezbytné apo B a MTP. Pro druhý krok, kde fúzuje pre-VLDL s tukovou kapénkou, jsou pak nutné ARF1 a PLD. Klíčovými faktory pro syntézu jsou dostupnost lipidů a regulace inzulinem, další roli pravděpodobně mají ACAT2, apo E a apo A-V.

První krok syntézy VLDL je podstatně lépe charakterizován než krok druhý. Funkce MTP a jeho interakce s apo B je již celkem podrobně popsána, formování tukové kapénky dosud nebyla věnována taková pozornost. Prozatím není zcela jasné, zda druhý krok probíhá v ER nebo GA.

Porozumění procesu syntézy VLDL pomohlo k objasnění patogeneze vzácných genetických chorob, jako je familiární hypobetalipoproteinémie a abetalipoproteinémie. Poruchy v syntéze VLDL výrazně přispívají k patologickým změnám v transportu TG u pacientů s diabetem II. typu - detailní pochopení mechanismu těchto změn by mohlo vést k účinnější léčbě diabetu II. typu a účinnější prevenci kardiovaskulárních onemocnění u diabetiků.

7. SEZNAM ZKRATEK

α-SNAP	α synaptosomal-associated protein	Protein asociovaný se synaptozómy
ABL	Abetalipoproteinemia	Abetalipoproteinémie
ABCA1	ATP-binding cassette A1	Transportér A1 z rodiny ATP vazebných proteinů
ABCG1	ATP-binding cassette G1	Transportér G1 z rodiny ATP vazebných proteinů
ACAT2	Acyl-coenzym A:cholesterol acyltransferase 2	Acyl-koenzym A cholesterol acyltransferáza 2
ADRP	Adipocyte differentiation-related protein	Protein nezbytný pro tvorbu tukové kapénky
Akt (PKB)	Proteinkinase B	Proteinkináza B
Apo A	Apolipoprotein A	Apolipoprotein A
Apo B	Apolipoprotein B	Apolipoprotein B
Apo C	Apolipoprotein C	Apolipoprotein C
Apo E	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E
ANGPTL3	Angiopietin-like protein 3	Protein podobný angiopoetinu 3
Apobec-1	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 1	Apo B mRNA editující enzym
ARF1	ADP-ribosylation factor 1	ADP-ribosylační faktor 1
BFA	Brefeldin A	Brefeldin A
CE	Cholesteryl ester	Ester cholesterolu
COPII	Coat protein II	Proteinový komplex umožňující pučení váčků z ER
Da	Dalton	Dalton
DG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase	Diacylglycerol acyltransferáza
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplasmatické retikulum
ERGIC	ER-GA intermedial compartment	ER-GA intermediální kompartment
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase 2	Extracelulárním signálem regulovaná kináza typu 2
FA	Fatty acid	Mastná kyselina
FHBL	Familial hypobetalipoproteinemia	Familiární hypobetalipoproteinémie
FoxO1	Forkhead box O1	Transkripční faktor na vážící se na inzulínový regulační element
GA	Golgi apparatus	Golgiho aparát
GDP	Guanosine diphosphate	Guanosine difosfát
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosin trifosfát
GRP-78	Glucose-regulated protein 78	Protein tukových kapének
HDL	High density lipoprotein	Lipoprotein o vysoké hustotě
HSP70	Heat-shock protein 70	Protein teplotního šoku typ 70

HTGL	Hepatic-triacylglycerol lipase	Jaterní lipáza
IDL	Intermediate density lipoprotein	Lipoprotein o střední hustotě
Insr	Insulin receptor	Receptor pro inzulín
IRS	Insulin receptor substrate	Substrát pro inzulínový receptor
KDEL	Lys-Asp-Glu-Leu	Lysin-kyselina asparagová- kyselina glutamová-leucin
LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferase	Lecithin-cholesterol- acyltransferáza
LDL	Low density lipoprotein	Lipoprotein o nízké hustotě
LDL-C	Low density lipoprotein- cholesterol	LDL-cholesterol
LDL-R	Low density lipoprotein receptor	LDL receptor
LPL	Lipoprotein lipase	Lipoproteinová lipáza
LRP	LDL-R related protein	Remnantní receptor
MTP	Microsomal TG transfer protein	Mikrozomální protein přenášeující TG
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor	Protein účastnící se tvorby tukové kapénky
PA	Phosphatidic acid	Kyselina fosfatidová
PC	Phosphatidylcholin	Fosfatidylcholin
PCSK9	Proprotein invertase subtilisin/kexin type 9	Proprotein konvertáza subtilisin/kexin typu 9
PDI	Protein disulfid isomerase	Protein disulfid izomeráza
PI3-K	Phosphoinositide 3-kinase	Fosfoinositid 3 kináza
PLD	Phospholipase D	Fosfolipáza D
SNAP23	Synaptosomal-associated protein 23	Protein nezbytný pro fúzi tukových kapének
SNARE	SNAP receptor	Receptor pro SNAP
TG	Triglyceride	Triacylglycerol/Triglycerid
VAMP4	Vesicle-associated membrane protein 4	Protein nezbytný pro fúzi tukových kapének
VLDL	Very low density lipoprotein	Lipoprotein o velmi nízké hustotě

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Gibbons, G. F. 1990. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J* **268**: 1-13.
2. Guha, M., and O. Gursky. 2011. Human Plasma Very Low-Density Lipoproteins Are Stabilized by Electrostatic Interactions and Destabilized by Acidic pH. *J Lipids* **2011**: 493720.
3. Voet, D., Voet, J.G. 2004. Biochemistry John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
4. Mahley, R. W., T. L. Innerarity, S. C. Rall, Jr., and K. H. Weisgraber. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* **25**: 1277-1294.
5. Gotto, A. M., Jr., Pownall, H. 2003. Manual of Lipid Disorders. Reducing the Risk for Coronary Heart Disease. Third ed. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia.
6. Dominiczak, M. H., and M. J. Caslake. 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem* **48**: 498-515.
7. Schaefer, E. J., S. Eisenberg, and R. I. Levy. 1978. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res* **19**: 667-687.
8. Kluger, M., J. Heeren, and M. Merkel. 2008. Apoprotein A-V: An important regulator of triglyceride metabolism. *J Inherit Metab Dis*.
9. Novák, F. 2002. Úvod do klinické biochemie. 1. ed. Karolinum, Praha.
10. Lorec, A. M., C. Juhel, Y. Pafumi, H. Portugal, A. M. Pauli, D. Lairon, and C. Defoort. 2000. Determination of apolipoprotein B-48 in plasma by a competitive ELISA. *Clin Chem* **46**: 1638-1642.
11. Pennacchio, L. A., M. Olivier, J. A. Hubacek, J. C. Cohen, D. R. Cox, J. C. Fruchart, R. M. Krauss, and E. M. Rubin. 2001. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* **294**: 169-173.
12. Nelbach, L., X. Shu, R. J. Konrad, R. O. Ryan, and T. M. Forte. 2008. Effect of apolipoprotein A-V on plasma triglyceride, lipoprotein size, and composition in genetically engineered mice. *J Lipid Res* **49**: 572-580.
13. Nilsson, S. K., J. Heeren, G. Olivecrona, and M. Merkel. 2011. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis* **219**: 15-21.
14. Cladaras, C., M. Hadzopoulou-Cladaras, R. T. Nolte, D. Atkinson, and V. I. Zannis. 1986. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *Embo J* **5**: 3495-3507.
15. Kane, J. P., D. A. Hardman, and H. E. Paulus. 1980. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 2465-2469.
16. Glickman, R. M., M. Rogers, and J. N. Glickman. 1986. Apolipoprotein B synthesis by human liver and intestine in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5296-5300.
17. Blanc, V., and N. O. Davidson. 2010. APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**: 594-602.
18. Chen, S. H., G. Habib, C. Y. Yang, Z. W. Gu, B. R. Lee, S. A. Weng, S. R. Silberman, S. J. Cai, J. P. Deslypere, M. Rosseneu, and et al. 1987. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* **238**: 363-366.
19. Olofsson, S. O., L. Asp, and J. Boren. 1999. The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **10**: 341-346.
20. Gordon, D. A., H. Jamil, R. E. Gregg, S. O. Olofsson, and J. Boren. 1996. Inhibition of the microsomal triglyceride transfer protein blocks the first step of apolipoprotein B lipoprotein assembly but not the addition of bulk core lipids in the second step. *J Biol Chem* **271**: 33047-33053.
21. Olofsson, S. O., and J. Boren. 2005. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* **258**: 395-410.

22. Bostrom, K., J. Boren, M. Wettsten, A. Sjoberg, G. Bondjers, O. Wiklund, P. Carlsson, and S. O. Olofsson. 1988. Studies on the assembly of apo B-100-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J Biol Chem* **263**: 4434-4442.
23. Knott, T. J., S. C. Rall, Jr., T. L. Innerarity, S. F. Jacobson, M. S. Urdea, B. Levy-Wilson, L. M. Powell, R. J. Pease, R. Eddy, H. Nakai, and et al. 1985. Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. *Science* **230**: 37-43.
24. Knott, T. J., R. J. Pease, L. M. Powell, S. C. Wallis, S. C. Rall, Jr., T. L. Innerarity, B. Blackhart, W. H. Taylor, Y. Marcel, R. Milne, and et al. 1986. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* **323**: 734-738.
25. Olofsson, S. O., P. Stillemark-Billton, and L. Asp. 2000. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med* **10**: 338-345.
26. Gordon, D. A., J. R. Wetterau, and R. E. Gregg. 1995. Microsomal triglyceride transfer protein: a protein complex required for the assembly of lipoprotein particles. *Trends Cell Biol* **5**: 317-321.
27. Wetterau, J. R., K. A. Combs, S. N. Spinner, and B. J. Joiner. 1990. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem* **265**: 9800-9807.
28. Hussain, M. M., A. Bakillah, and H. Jamil. 1997. Apolipoprotein B binding to microsomal triglyceride transfer protein decreases with increases in length and lipidation: implications in lipoprotein biosynthesis. *Biochemistry* **36**: 13060-13067.
29. Jamil, H., C. H. Chu, J. K. Dickson, Jr., Y. Chen, M. Yan, S. A. Biller, R. E. Gregg, J. R. Wetterau, and D. A. Gordon. 1998. Evidence that microsomal triglyceride transfer protein is limiting in the production of apolipoprotein B-containing lipoproteins in hepatic cells. *J Lipid Res* **39**: 1448-1454.
30. Olofsson, S. O., P. Bostrom, L. Andersson, M. Rutberg, J. Perman, and J. Boren. 2009. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 448-458.
31. Marchesan, D., M. Rutberg, L. Andersson, L. Asp, T. Larsson, J. Boren, B. R. Johansson, and S. O. Olofsson. 2003. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. *J Biol Chem* **278**: 27293-27300.
32. Gusarova, V., J. Seo, M. L. Sullivan, S. C. Watkins, J. L. Brodsky, and E. A. Fisher. 2007. Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E. *J Biol Chem* **282**: 19453-19462.
33. Moss, J., and M. Vaughan. 1998. Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* **273**: 21431-21434.
34. Asp, L., B. Magnusson, M. Rutberg, L. Li, J. Boren, and S. O. Olofsson. 2005. Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 566-570.
35. Asp, L., C. Claesson, J. Boren, and S. O. Olofsson. 2000. ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem* **275**: 26285-26292.
36. Klausner, R. D., J. G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116**: 1071-1080.
37. Rustaeus, S., K. Lindberg, J. Boren, and S. O. Olofsson. 1995. Brefeldin A reversibly inhibits the assembly of apoB containing lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* **270**: 28879-28886.
38. Adiels, M., S. O. Olofsson, M. R. Taskinen, and J. Boren. 2008. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 1225-1236.

39. Gibbons, G. F., A. M. Brown, D. Wiggins, and R. Pease. 2002. The roles of insulin and fatty acids in the regulation of hepatic very-low-density lipoprotein assembly. *J R Soc Med* **95 Suppl 42**: 23-32.
40. Boren, J., S. Rustaeus, M. Wettesten, M. Andersson, A. Wiklund, and S. O. Olofsson. 1993. Influence of triacylglycerol biosynthesis rate on the assembly of apoB-100-containing lipoproteins in Hep G2 cells. *Arterioscler Thromb* **13**: 1743-1754.
41. Brown, A. M., and G. F. Gibbons. 2001. Insulin inhibits the maturation phase of VLDL assembly via a phosphoinositide 3-kinase-mediated event. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 1656-1661.
42. Kamagate, A., and H. H. Dong. 2008. FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production. *Cell Cycle* **7**: 3162-3170.
43. Mensenkamp, A. R., M. C. Jong, H. van Goor, M. J. van Luyn, V. Bloks, R. Havinga, P. J. Voshol, M. H. Hofker, K. W. van Dijk, L. M. Havekes, and F. Kuipers. 1999. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *J Biol Chem* **274**: 35711-35718.
44. van der Vliet, H. N., M. G. Sammels, A. C. Leegwater, J. H. Levels, P. H. Reitsma, W. Boers, and R. A. Chamuleau. 2001. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* **276**: 44512-44520.
45. Weinberg, R. B., and M. S. Spector. 1986. Lipoprotein affinity of human apolipoprotein A-IV during cholesterol esterification. *Biochem Biophys Res Commun* **135**: 756-763.
46. Temel, R. E., L. Hou, L. L. Rudel, and G. S. Shelness. 2007. ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res* **48**: 1618-1627.
47. Tarugi, P., M. Averna, E. Di Leo, A. B. Cefalu, D. Noto, L. Magnolo, L. Cattin, S. Bertolini, and S. Calandra. 2007. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis* **195**: e19-27.
48. Tibolla, G., G. D. Norata, R. Artali, F. Meneghetti, and A. L. Catapano. 2011. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): from structure-function relation to therapeutic inhibition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **21**: 835-843.
49. Bauer, R. C., I. M. Stylianou, and D. J. Rader. 2011. Functional validation of new pathways in lipoprotein metabolism identified by human genetics. *Curr Opin Lipidol* **22**: 123-128.
50. Schonfeld, G., X. Lin, and P. Yue. 2005. Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. *Cell Mol Life Sci* **62**: 1372-1378.
51. Collins, D. R., T. J. Knott, R. J. Pease, L. M. Powell, S. C. Wallis, S. Robertson, C. R. Pullinger, R. W. Milne, Y. L. Marcel, S. E. Humphries, and et al. 1988. Truncated variants of apolipoprotein B cause hypobetalipoproteinaemia. *Nucleic Acids Res* **16**: 8361-8375.
52. Blackhart, B. D., E. M. Ludwig, V. R. Pierotti, L. Caiati, M. A. Onasch, S. C. Wallis, L. Powell, R. Pease, T. J. Knott, M. L. Chu, and et al. 1986. Structure of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem* **261**: 15364-15367.
53. Ross, R. S., R. E. Gregg, S. W. Law, J. C. Monge, S. M. Grant, K. Higuchi, T. J. Triche, J. Jefferson, and H. B. Brewer, Jr. 1988. Homozygous hypobetalipoproteinemia: a disease distinct from abetalipoproteinemia at the molecular level. *J Clin Invest* **81**: 590-595.
54. Wetterau, J. R., L. P. Aggerbeck, M. E. Bouma, C. Eisenberg, A. Munck, M. Hermier, J. Schmitz, G. Gay, D. J. Rader, and R. E. Gregg. 1992. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* **258**: 999-1001.
55. Shoulders, C. C., D. J. Brett, J. D. Bayliss, T. M. Narcisi, A. Jarmuz, T. T. Grantham, P. R. Leoni, S. Bhattacharya, R. J. Pease, P. M. Cullen, and et al. 1993. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum Mol Genet* **2**: 2109-2116.