

Lipoproteinlerin Total Apolipoproteinlerinin Karbohidrat Kompozisyonlarının Karşılaştırılması*

Tayfun GÜLDÜR, Sema OZAN, Tülay İLERİ
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.06.1998

Özet: İnsan ve keçi serum lipoproteinlerinin apolipoproteinlerindeki bazı terminal karbohidrat artıkları araştırıldı. Fosfotungstik asit/MgCl₂ presipitasyonu ile separe edilen β -pre- β (apolipoprotein B içeren lipoproteinler) ve α lipoproteinlere ait apolipoproteinlere SDS-PAGE işlemi uygulandı ve daha sonra bu proteinler, nitrosellüloz membranlara transfer edildi (western blotting). Glikoproteinlerin karbohidrat zincirlerinde yaygın olarak bulunan bazı karbohidrat yapılarını tespit etmek üzere, her biri spesifik bir karbohidrat dizisini tanıyan digoxigenin işaretli lektinler, western blot membranları üzerine immobilize edilmiş apolipoproteinlerle inkübe edildi. Membran üzerindeki bağlı lektinin mevcudiyeti, alkalın fosfataz işaretli anti-digoxigenin antikor ile tespit edildi. Hem insan ve hem de keçi serumundaki β -pre- β lipoprotein fraksiyonunda tespit edilen ve apo B'ye benzer mobiliteye sahip protein bandında α (2→3) bağla galaktoza bağlı terminal sialik asit tespit edildi. Aranılan karbohidrat yapılarının hiçbiri α lipoprotein fraksiyonunda bulunamadı.

Anahtar Sözcükler: Lipoprotein, apolipoprotein, karbohidrat artığı

Comparison of Carbohydrate Compositions of Total Apolipoproteins in Lipoproteins

Abstract: Terminal carbohydrate moieties of apolipoproteins of lipoproteins in human and goat serum were ascertained and compared. Apolipoproteins of β -pre- β (apolipoprotein B containing lipoproteins) and α lipoproteins separated by phosphotungstic acid/MgCl₂ precipitation method were applied to SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane. Digoxigenin labelled lectins, each of which recognizes a specific sugar sequence, were incubated with apolipoproteins immobilized on a western blot membrane to probe some of carbohydrate structures commonly found in carbohydrate chains of glycoproteins. The presence of bound lectin on the membrane was detected with alkaline phosphatase labelled antidigoxigenin antibody. Sialic acid terminally linked α (2→3) to galactose was detected on the largest protein band in β -pre- β lipoprotein fraction of both human and goat serum with the mobility identical to that of apo B. Neither of the carbohydrate moieties probed were found to be present in α lipoproteins.

Key Words: Lipoprotein, apolipoprotein, carbohydrate moiety

Giriş

Plasma lipoproteinleri; protein (apolipoprotein) ve lipid (kolesterol, kolesteril esteri, fosfolipid ve triasilgliserol) ihtiva eden suda çözünür komplekslerdir (1-3). Her bir lipoproteinde bir veya daha fazla apolipoprotein bulunmaktadır. Apolipoproteinlerin dağılımı o lipoproteini karakterize etmektedir. Apolipoproteinler, enzim kofaktörü olarak (örneğin, apo C-II, lipoprotein lipaz (LPL) için) ve dokulardaki lipoprotein reseptörleri tarafından tanınmada ligand olarak (örneğin, apo B-100 ve apo E LDL reseptörü için) önemli roller üstlenirler (1,2).

Bazı apolipoproteinler, apo B (3-6), apo C-III (7) ve apo E (8-10), glikoprotein yapısındadır. Ashwell ve Mo-

rell (11) kanda bulunan glikoproteinlerin dolaşımdan süratle uzaklaştırılmalarında terminal karbohidrat artıklarının belirleyici bir rol oynadıklarına dikkat çekmişlerdir. Sialik asit (N-asetilnöyraminik asit) artıklarının uzaklaştırılması neticesinde açığa çıkan galaktozillerin, bu proteinlerin serumdan uzaklaştırılmasında önemli determinantlar oldukları (11,12) ve bunların karaciğerdeki spesifik proteinler tarafından (asialoglikoprotein reseptörleri) (13) tanınıp alındığı ortaya konmuştur. Şilomikron (15,18) ve LDL (16-18) metabolizmalarında desializasyon için fizyolojik bir rol ileri sürülmüştür. Yukarıdaki veriler birlikte değerlendirildiğinde, lipoprotein metabolizmasında özellikle terminal karbohidrat artıklarının rol alabilecekleri or-

* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1036) tarafından desteklenmiştir.

taya çıkmaktadır ki bu da apolipoproteinlerin terminal karbohidrat kompozisyon ve konfigürasyonunun belirlenmesini gerekli kılmaktadır.

Bu araştırmada, bu amaçla, çeşitli lipoprotein fraksiyonlarına ait apolipoproteinlerde yaygın olarak bulunan bazı terminal oligosakkarid zincirlerin araştırılması, birbirleri ile karşılaştırılması ve mevcut bilgiler ışığında muhtemel farklılıkların metabolik rollerinin tartışılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Sağlıklı insanlardan aç karnına ve Elazığ Elet Tic.A.Ş. Mezbahası'nda kesilen keçilerden elde edilen kan serumları çalışmanın materyalini oluşturdu.

Metod

Sellüloz-asetat lipoprotein elektroforezi: Serum numuneleri etilen glikolde hazırlanmış Sudan Black B ile ön boyama işlemine tabi tutuldu (19). Sellüloz-asetat lipoprotein elektroforezi Beckering ve Ellefson (20) metodu-na göre yapıldı.

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezis): Discontinuous SDS-PAGE tekniği kullanıldı. Laemmli (21) metodu, vertikal slab jel (10x8cm) Hoefer SE 250 sistemine (Hoefer Scientific Instruments, A.B.D.) uygun olarak modifiye edildi.

Fosfotungstik asit/MgCl₂ ile serum lipoproteinlerinin separasyonu: İnsan serum lipoproteinleri, fosfotungstik asit/MgCl₂ presipitasyonu ile separe edildi (22). 0.5 ml insan serumunda β+pre-β lipoproteinleri presipite etmek için 1.11 μmol fosfotungstik asit/50 μmol MgCl₂ kullanıldı. 4500 rpm'de 30 dak. süre ile yapılan santrifüj neticesinde meydana gelen presipitattan ayrılan süpernatanta 1.11 μmol fosfotungstik asit/50 μmol MgCl₂ eklenerek yine aynı şartlar altında santrifügasyonla α lipoproteinlerin presipitasyonu sağlandı. 0.5 ml keçi serumunda β+pre-β lipoproteinlerin presipitasyonu için 1.76 μmol fosfotungstik asit/80 μmol MgCl₂, α lipoproteinlerin presipitasyonu için 4.44 μmol fosfotungstik asit/200 μmol MgCl₂ kullanıldı (23). Santrifügasyon neticesinde şekillenen presipitatlar %10 sodyum sitrat içerisinde, amonyum klorür kristalleri eklenerek 37°C'de çözüldü (24).

Dializ: Çözünen presipitatlar dializ torbaları içerisinde konularak dializ işlemine tabi tutuldu (24).

Elektroforetik transfer (Western Blotting): Burnette (25) ve Towbin (26) metodlarından yararlanıldı. 9x10.5cm, 0.45 mikron nitrosellüloz membranlar kullanıldı.

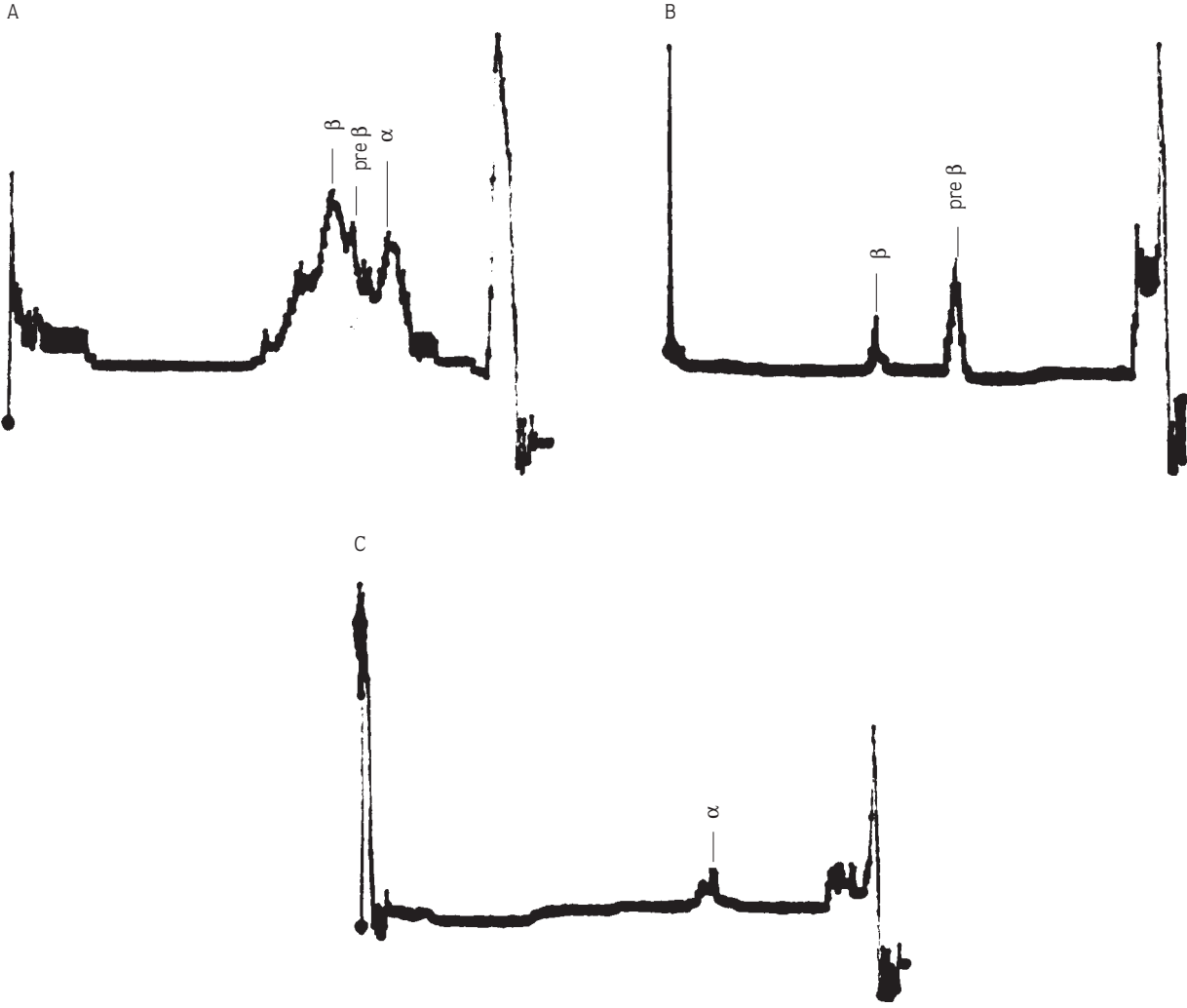
Apolipoproteinlerdeki bazı terminal karbohidrat zincirlerinin karakterizasyonu (immunoblotting): Nitrosellüloz membrana nakledilen proteinlerdeki terminal karbohidrat artıklarının tespiti amacıyla DIG Glycan Differentiation Kit (Boehring, Cat.No.1210238) kullanıldı. Bu kit, her biri spesifik bir karbohidrat dizisini tanıyan digoxigenin işaretli lektinleri ihtiva etmektedir.

Kullanılan lektinler ve spesifiteleri: Apolipoproteinlerdeki karbohidrat artıklarının tespiti amacıyla, glikoproteinlerin karbohidrat zincirlerinde yaygın olarak bulunan 4 farklı karbohidrat yapısının belirlenmesinde aşağıdaki 4 farklı lektinden faydalanıldı: 1. GNA (Galanthus nivalis agglutinin): α (1→3), α(1→6) veya α(1→2) bağla mannoza bağlanmış terminal mannoz için spesifiktir. 2. MAA (Maackia amurensis agglutinin): α (2→3) bağla galaktoza bağlanmış sialik asiti (SAα(2-3)Gal) tespit eder. 3. PNA (Peanut agglutinin): Galaktoz β (1→3)-N-asetilgalaktozamin yapılarına bağlanır. 4. DSA (Datura stramonium agglutinin): Galaktoz β (1→4)-N-asetilglukozamin yapıları için spesifiktir. Karbohidrat artıklarının tespiti, DIG Glycan Differentiation Kit prosedüründe (Cat.No.1210238) belirtildiği gibi yapıldı.

Bulgular

A. Serum β+ pre-β ve α lipoproteinlerin separasyonu: Kullanılan fosfotungstik asit/MgCl₂ konsantrasyonunun keçi serumunda istenilen lipoprotein fraksiyonunu çöktürüp çöktürmediği elektroforetik dansitometrik analizler ile önceki araştırmalarımızda teyit edilmişti. İnsan β+pre-β ve α lipoproteinlerin aynı şekilde fosfotungstik asit/MgCl₂ presipitasyonu ile separasyonlarının doğrulanması sellüloz asetat elektroforezi ve 540-580nm'de uygulanan dansitometrik analizler ile gerçekleştirildi (Şekil 1A,B,C). Buna göre, insan serumuna 1.11μmol fosfotungstik asit/ 50 μmol MgCl₂ ilavesi ile β+pre-β lipoproteinlerin presipitasyonu sağlandı (Şekil 1B). Oluşan süpernatanta, presipitat uzaklaştırıldıktan sonra aynı miktarda fosfotungstik asit/MgCl₂ ilavesiyle α lipoproteinlerin presipite olduğu Şekil 1C'de görülmektedir.

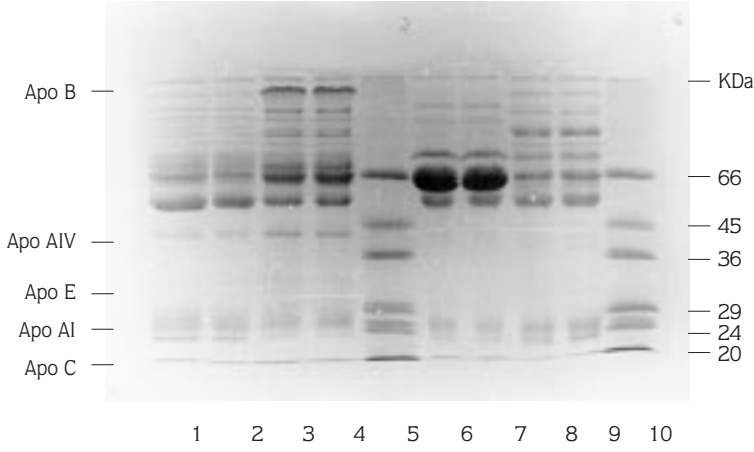
B. β+pre-β ve α lipoproteinlerin apolipoprotein profili: SDS-PAGE ile ortaya konan insan ve keçi β+pre-β ve α lipoproteinlerin apolipoprotein kompozisyonu Şekil



Şekil 1. İnsan serum β + pre- β ve α lipoproteinlerinin fosfotungstik asit/ $MgCl_2$ presipitasyon metodu ile separasyonlarına ait sellüloz-asetat elektroforetogramları. A: Serum lipoproteinleri; B: Fosfotungstik asit/ $MgCl_2$ ile separe edilen β + pre- β lipoproteinler; C: Fosfotungstik asit/ $MgCl_2$ ile separe edilen α lipoproteinler.

2.1-2.4'de gösterilmiştir. İnsan β + pre- β ve α lipoprotein fraksiyonundaki düşük molekül ağırlıklı (14.000-66.000Da) apolipoprotein kompozisyonunda benzerlik gözlenmektedir. Apo A-IV, A-I, E ve C'lerin her iki fraksiyonda da mevcut olduğu görülmektedir. Ancak apo A-IV, β + pre- β fraksiyonunda daha belirgin olarak bulunmaktadır. İki lipoprotein fraksiyonu arasındaki en belirgin fark, en büyük molekül ağırlığına sahip proteinlerde görülmektedir. β + pre- β lipoprotein fraksiyonunda en büyük molekül ağırlıklı apolipoproteinler olarak apo B bulunmaktadır. Oysa α lipoprotein fraksiyonunda apo B bulunmamaktadır (Şekil 2.1-2.4).

Keçi β + pre- β ve α lipoprotein fraksiyonlarında düşük molekül ağırlıklı apolipoproteinlerin kompozisyonunda da benzerlik bulunmaktadır (Şekil 2.6-2.9). Her iki fraksiyonda da apo A-I ve C bulunmasına karşın, insandakinin aksine apo A-IV ve E belirgin değildir. İki lipoprotein fraksiyonu arasındaki en belirgin fark, insan lipoproteinlerinde olduğu gibi, yine en büyük molekül ağırlığına sahip proteinlerde gözlenmektedir. İnsanda apo B'ye benzer mobiliteye sahip bir protein bandının keçi β + pre- β fraksiyonunda mevcut olmasına karşın bu bant α fraksiyonunda bulunmamaktadır (Şekil 2.6-2.9).



Şekil 2. İnsan ve keçi serum $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α lipoprotein apolipoproteinlerinin SDS- Poliakrilamid jel elektroforetogramı. 1,2: İnsan α lipoprotein apolipoproteinleri; 3,4: İnsan $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein apolipoproteinleri; 5: Protein standartları; 6,7: Keçi (lipoprotein apolipoproteinleri; 8,9 : Keçi $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein apolipoproteinleri; 10 : Protein standartları.

C. $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α lipoprotein apolipoproteinlerinin karbohidrat kompozisyonları:

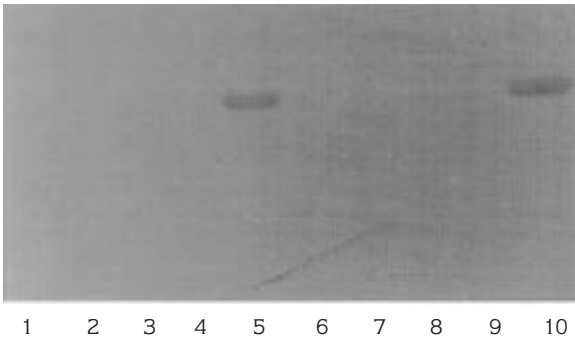
1. Terminal mannoz: Bu grubun tespiti için digoxigenin işaretli GNA lektin kullanıldı. Bu reaksiyon neticesinde ne insan (Şekil 3) ne de keçi (Şekil 7) serum lipoproteinlerinin ($\beta + \text{pre-}\beta$ ve α) apolipoproteinlerinde pozitif bir reaksiyon tespit edilemedi. Kontrol glikoproteini olarak transferrin kullanıldı ve GNA ile pozitif reaksiyon tespit edildi (Şekil 3.4, 3.10 ve 7.1, 7.2).

2. α (2→3) bağla galaktoza terminal olarak bağlı sialik asit: Bunun için digoxigenin işaretli MAA lektin kullanıldı. Serum $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein fraksiyonundaki en yüksek molekül ağırlığına sahip, insanda bir (muhtemelen apo B) (Şekil 4.6-4.8), keçide ise birbirine çok yakın ve insandakine benzer molekül ağırlığına sahip iki protein

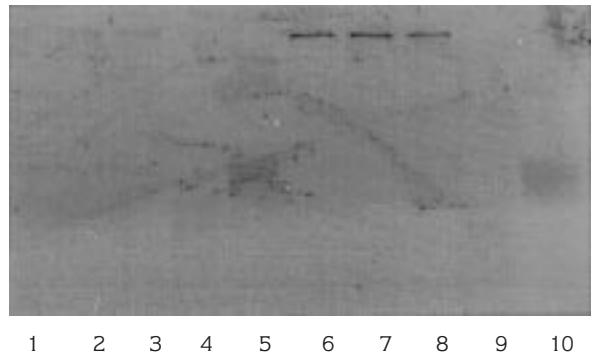
bandında terminal sialik asit tespit edildi (Şekil 8.6-8.9). Ancak her iki türün α lipoprotein fraksiyonunda da bu grup belirlenemedi (Şekil 4.1-4.4 ve 8.1-8.4). Kontrol glikoproteini olarak kullanılan fetuin'de pozitif reaksiyon tespit edildi (Şekil 4.5, 4.10 ve 8.5, 8.10).

3. Galaktoz $\beta(1\rightarrow3)$ -N-asetilgalaktozamin: Bu karbohidrat grubunun belirlenmesi amacıyla PNA lektin ile yapılan inkübasyon neticesinde her iki türde de hiç bir lipoprotein fraksiyonunda bu disakkarid belirlenemedi (Şekil 5.1-5.3, 5.5-5.9 ve 9.2-9.5, 9.7-9.10). Kontrol glikoproteini olarak kullanılan asialofetuin ile pozitif reaksiyon tespit edildi (Şekil 5.4, 5.10 ve 8.1, 8.6).

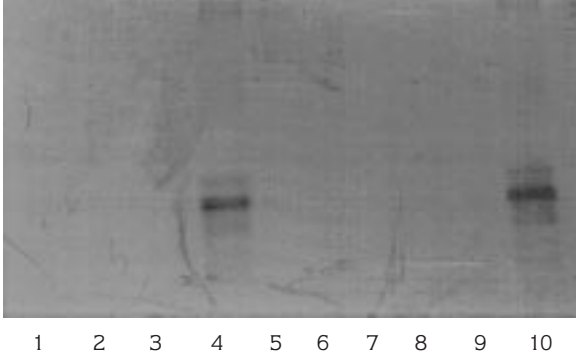
4. Galaktoz $\beta(1\rightarrow4)$ -N-asetilglukozamin: Bu disakkaridin belirlenmesi için DSA lektin ile yapılan immunoblot analizinde her iki türün $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α lipoprotein frak-



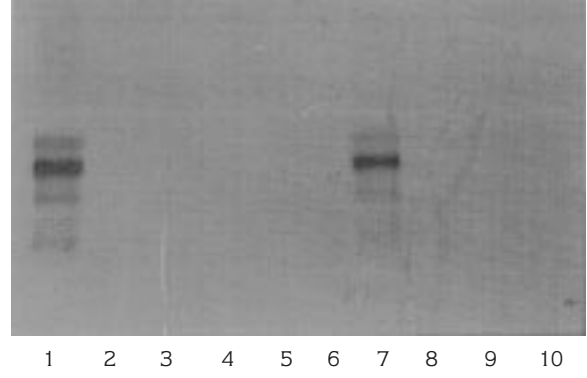
Şekil 3. İnsan serum $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α lipoprotein apolipoproteinlerinde terminal mannozun tespiti için GNA lektin ile yapılan immunoblot analizi. 1,2,3,4: α lipoprotein apolipoproteinleri; 6,7,8,9: $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein apolipoproteinleri; 5,10: Kontrol glikoproteini (karboksipeptidaz Y).



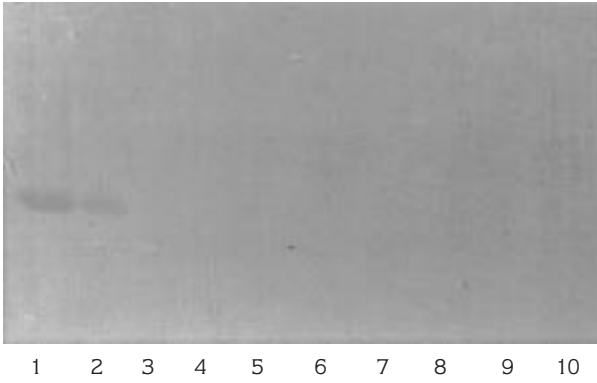
Şekil 4. İnsan serum $\beta + \text{pre-}\beta$ ve α lipoprotein apolipoproteinlerinde terminal SA $\alpha(2-3)$ Gal yapısının tespiti amacıyla MAA lektin ile yapılan immunoblot analizi. 1,2,3,4: α lipoprotein apolipoproteinleri; 6,7,8: $\beta + \text{pre-}\beta$ lipoprotein apolipoproteinleri; 5,10: Kontrol glikoproteini (fetuin).



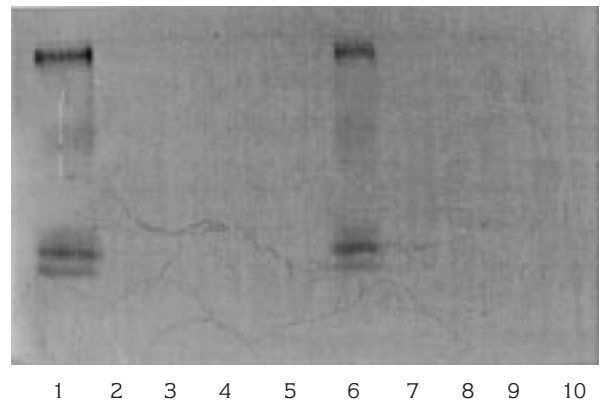
Şekil 5. İnsan serum β + pre- β ve α lipoprotein apolipoproteinlerinde $\beta(1-3)$ -N-asetilgalaktozamin'in tespiti amacıyla PNA lektin ile yapılan immunoblot analizi. 1,2,3: α lipoprotein apolipoproteinleri; 5,6,7,8,9: β + pre- β lipoprotein apolipoproteinleri; 4,10: Kontrol glikoproteini (asialofetuin).



Şekil 6. İnsan serum β + pre- β ve α lipoprotein apolipoproteinlerinde galaktoz $\beta(1-4)$ -N-asetilglukozamin'in tespiti amacıyla DSA lektin ile yapılan immunoblot analizi. 6,8,9,10: α lipoprotein apolipoproteinleri; 2,3,4,5: β + pre- β lipoprotein apolipoproteinleri; 1,7: Kontrol glikoproteini (asialofetuin).



Şekil 7. Keçi serum β + pre- β ve α lipoprotein apolipoproteinlerinde terminal mannozün tespiti için GNA lektin ile yapılan immunoblot analizi. 7,8,9,10: α lipoprotein apolipoproteinleri; 3,4,5,6: β + pre- β lipoprotein apolipoproteinleri; 1,2: Kontrol glikoproteini (karboksipeptidaz Y).



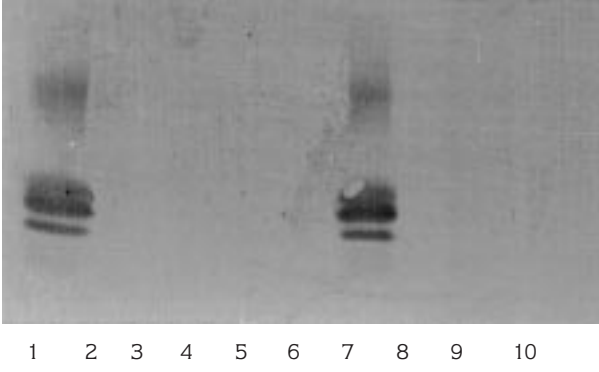
Şekil 8. Keçi serum β + pre- β ve α lipoprotein apolipoproteinlerinde terminal SA $\alpha(2-3)$ Gal yapısının tespiti amacıyla MAA lektin ile yapılan immunoblot analizi. 1,2,3,4: α lipoprotein apolipoproteinleri; 6,7,8,9: β + pre- β lipoprotein apolipoproteinleri; 5,10: Kontrol glikoproteini (fetuin).

siyonlarının hiçbirinde bu disakkarid tespit edilemedi (Şekil 6.2-6.6 , 6.8-6.10 ve 10.2-10.5 , 10.7-10.10) .Kontrol glikoproteini olarak kullanılan asialofetuin de ise bu yapının mevcudiyeti belirlendi (Şekil 6.1 , 6.7 ve 10.1 , 10.7).

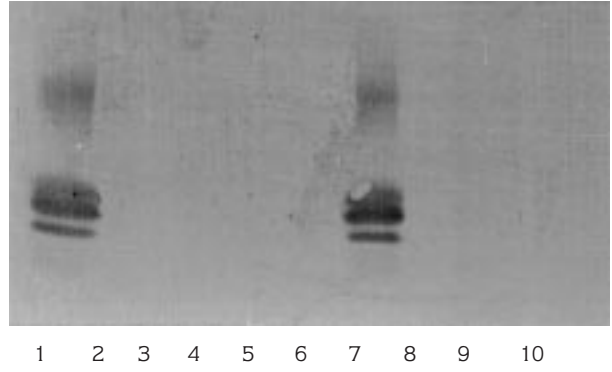
Tartışma

İnsan serumundaki β + pre- β lipoprotein fraksiyonunda mevcut olan en yüksek molekül ağırlıklı protein bandında α (2 \rightarrow 3) bağla galaktoza terminal olarak bağlı sialik asit (SA $\alpha(2-3)$ Gal) tespit edildi. Apo B-100'ün bi-

linen en büyük proteinlerden biri olması ve en yüksek molekül ağırlığına sahip apolipoprotein olması nedeniyle (550 kDa) (27-29), bu protein bandının apo B-100'e ait olması kuvvetle muhtemeldir. İnsan serum LDL fraksiyonunda bulunan apo B-100'ün, asparajin bağlı karbohidrat zincirlerinde bir nötral, iki asidik fraksiyonun bulunduğu ve asidik fraksiyonlarda monosialize ve disialize biantenary kompleks tipte oligosakkaridler bulunduğu bildirilmiştir (3-5). Ancak sialik asitlerin bu yapı içerisinde yapmış olduğu bağın türü ve anomerik konfigürasyonu konusunda bir araştırmaya rastlanılmamıştır.



Şekil 9. Keçi serum β + pre- β ve α lipoprotein apolipoproteinlerinde $\beta(1-3)$ -N-asetilgalaktozamin'in tespiti amacıyla PNA lektin ile yapılan immunoblot analizi. 7,8,9,10: α lipoprotein apolipoproteinleri; 2,3,4,5: β + pre- β lipoprotein apolipoproteinleri; 1,6: Kontrol glikoproteini (asialofetuin).



Şekil 10. İnsan serum β + pre- β ve α lipoprotein apolipoproteinlerinde galaktoz $\beta(1-4)$ -N-asetilglukozamin'in tespiti amacıyla DSA lektin ile yapılan immunoblot analizi. 6,8,9,10: α lipoprotein apolipoproteinleri; 2,3,4,5: β + pre- β lipoprotein apolipoproteinleri; 1,7: Kontrol glikoproteini (asialofetuin).

Keçi serumundaki β + pre- β lipoprotein fraksiyonundaki proteinler arasında en yüksek molekül ağırlığına sahip birbirine çok yakın iki protein bandında SA $\alpha(2-3)$ Gal tespit edildi. Bu proteinler poliakrilamid jel üzerinde göç ettikleri yer, diğer bir deyişle molekül ağırlıkları itibarıyla her ne kadar insan apo B'sinin keçideki karşılığı gibi anlaşılabilirler de, keçi serumundaki apo B'nin yapı ve kompozisyonu konusunda bir çalışmaya rastlanılmamış olması nedeniyle sağlıklı bir karşılaştırma yapmak güçtür.

İnsan VLDL apo E (7) ve apo C-III'ünde (8-10) bulunan karbohidrat zincirlerinde de sialik asidin mevcudiyeti bildirilmiştir. Fakat, yapılan çalışmada apo E ve apo C-III'de SA $\alpha(2-3)$ Gal oligosakkaridi tespit edilemedi. Ancak glikoproteinlerde SA $\alpha(2-3)$ Gal'den (30) başka terminal SA $\alpha(2-4)$ Gal ve SA $\alpha(2-6)$ Gal oligosakkaridlerinin de mevcut olduğu bildirilmiştir (31). Bu yapıların bu apolipoproteinlerde mevcut olup olmadığı ancak bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalardan sonra aydınlanabilecektir.

Bu çalışmada serum lipoproteinlerinin izolasyonu amacıyla kullanılan fosfatungstik asit/MgCl₂ presipitasyon metodu ile apolipoprotein B içeren lipoproteinlerin tam bir şekilde çöktüğü (22) ancak HDL'in az da olsa serum proteinleri ile kontamine olabileceği bildirilmiştir (24). Bu çalışmada her ne kadar presipitasyonla separe edilen fraksiyonların teyidi sellüloz asetat elektroforezi ile yapılmışsa da, bazı serum proteinlerinin kopresipitasyonu da mümkündür. Ancak halihazırdaki bilgilerimiz ışığında, serum glikoproteinlerinden insan IgG'sinde (MW:150kDa), bovine koagülasyon faktörlerinden faktör IX (MW:55kDa), X

(MW: 56kDa) ve prothrombin'de (MW: 72kDa) SA $\alpha(2\rightarrow3)$ Gal yapısının mevcut olduğunu biliyoruz (30-31). Kopresipitasyon olsa bile bu glikoproteinlerin molekül ağırlıklarının apo B-100'ünküne (550kDa) göre çok düşük olmaları nedeniyle sonucu etkilemeleri mümkün gözükmemektedir.

Terminal mannoz, hibrid ve yüksek mannoz tipte; Galaktoz $\beta(1\rightarrow4)$ -N-asetilglukozamin disakkaridi ise kompleks ve hibrid tipteki N-glikan zincirlerde mevcuttur. Ancak her iki yapıda lipoprotein fraksiyonlarında tespit edilememiştir. Her ne kadar PNA ile yapılan analizler neticesinde incelenen hiç bir lipoprotein fraksiyonunda Galaktoz $\beta(1\rightarrow3)$ -N-asetilgalaktozamin tespit edilememişse de bu söz konusu disakkaridin mevcut olmadığı anlamına gelmeyebilir. Çünkü bu disakkarid, O-glikanların çekirdek (iç) ünitesini oluşturabilmektedir. Bazı durumlarda bu disakkaride bir veya iki tane sialik asit bağlanabilmektedir (31). Bu nedenle bu analizin, sialik asitlerin neuraminidase ile uzaklaştırılmasından sonra tekrarlanmasında fayda olacaktır.

Apolipoproteinlerdeki sialik asidin lipoprotein metabolizmasında oynadığı role ilişkin çeşitli araştırmalar mevcuttur. Şilomikronların in vitro desializasyonunun bu lipoproteinlerin çeşitli dokular tarafından alınmalarını ve metabolizmalarını hızlandırdığı (15), buna ilaveten, şilomikron artıklarının asialoglikoprotein reseptörlerine karşı LDL'den 100 kat daha fazla bir affinite gösterdiği bildirilmiştir (18). Bu konuda karşıt bulgular da mevcuttur. In vitro LDL desializasyonunun bu lipoproteinlerin sirkülas-

yondan uzaklaştırılmalarını ve hepatik veya ekstrahepatik dokulardaki katabolizmalarını etkilemediği tespit edilmiştir (33). Ayrıca şilomikron artıkları ve asialoglikoprotein metabolizmalarının birbirinden bağımsız olduğu ileri sürülmüştür (34). Desializasyon için çeşitli fizyolojik mekanizmalar ileri sürülmüştür. Apo E'nin sialo apo E olarak sentez edilip salgılandığı ve müteakiben plazmada desialize edildiği gösterilmiştir (14). Koroner aterosklerosis'li hastaların LDL sialik asit içeriği normallere göre 2.5-5 kat daha düşük bulunmuş, lipoprotein desializasyonu ve lipid akümüasyonu arasındaki korelasyona dikkat çekilmiştir (32). Her ne kadar desializasyon için bu şekilde fizyolojik bir mekanizma ileri sürülmüşse de desializasyonun

fizyolojik olarak in vivo meydana geldiğine dair henüz direkt kanıtlar mevcut değildir.

Çeşitli karbohidratlara karşı spesifik lektinler, glikoproteinlerin separasyonlarında ve saflaştırılmalarında lektin kromatografisi (35) veya kantitatif presipitasyon (36) yoluyla kullanılmaktadır. Bu araştırmanın sonucundan hareketle, MAA lektin kullanılarak yukarıda bahsedilen metotlar ile serumdan β + pre- β lipoproteinlerin separe edilip edilemeyeceği ve lipoprotein fraksiyonları arasında başka karbohidrat grup farklılıklarının olup olmadığı konusu ancak bu konudaki daha ileri araştırmalarla aydınlanabilecektir.

Kaynaklar

1. Scanu, A.M. : Plasma Lipoproteins : An Overview in Biochemistry and Biology of Plasma Lipoproteins, ed: Spector, A.A., Marcel Dekker Inc., U.S.A. 1986; p:1-27.
2. Brewer, H.B., Gregg, R.E., Hoeg, J.M., Fojo, S.S.: Apolipoproteins and Lipoproteins in Human Plasma: An Overview. Clin.Chem. 1988; 34, (8(B)): B4-8.
3. Swaminathan, N., Aladjem, F. : The Monosaccharide Composition and Sequence of the Carbohydrate Moiety of Human Serum LDL. Biochemistry. 1976; 15: 1516-1522.
4. Taniguchi, T., Ishikawa, Y., Tsunemitsu, M., Fukuzaki, H. : The Structures of the Asparagine-Linked Sugar Chains of Human Apolipoprotein B-100. Arch.Biochem. Biophys. 1989; 273, (1): 197-205.
5. Vauhkonen, M., Viitala, J., Parkkinen, J., Rauvala, H. : High-Mannose Structure of Apolipoprotein B from Low Density Lipoproteins of Human Plasma. Eur.J.Biochem. 1985; 152: 43-50.
6. Sasak, W.V., Lown, J.S., Colburn, K.A.: Human Small Intestinal Apolipoprotein B-48 Oligosaccharide Chains. Biochem.J. 1991; 274:159-165.
7. Jain, R.S., Quarfordt, S.H. : The Carbohydrate Content of Apolipoprotein E from Human Very Low Density Lipoproteins. Life Sciences. 1979; 25:1315-1324.
8. Brewer, H.B., Shulman, R., Herbert, P., Ronan, R., Wehrly, K. : The Complete Amino Acid Sequence of Alanine Apolipoprotein (Apo C-III), an Apolipoprotein from Human Plasma Very Low Density Lipoproteins. J.Biol.Chem. 1974; 249: 4975-4984.
9. Vaith, P., Assmann, G., Uhlenbruck, G.: Characterization of the Oligosaccharide Side Chain of Apolipoprotein C-III from Human Plasma Very Low Density Lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta. 1978; 541:234-240.
10. Maeda, H., Hashimoto, R.K., Ogura, T., Hiraga, S., Uzawa, H. : Molecular Cloning of a Human Apo C-III Variant: Thr74→Ala74 Mutation Prevents O-Glycosylation. J.Lipid Res. 1987; 28: 1405-1409.
11. Ashwell, G., Morell, A.G.: The Role of Surface Carbohydrates in the Hepatic Recognition and Transport of Circulating Glycoproteins. Adv.Enzymol. 1974; 41:99-128.
12. Van Den Hamer, C.J.A., Morell, A.G., Scheinberg, I.H. : Physical and Chemical Studies on Ceruloplasmin. J.Biol.Chem. 1970; 245:4397-4402.
13. Pricer Jr., W.E., Ashwell, G.: Sub-cellular Distribution of a Mammalian Hepatic Binding Protein for Asialoglycoprotein. J.Biol.Chem.1976; 251:7539-7544.
14. Zannis, V.I., McPherson, J., Goldberger, G., Karathanasis, S.K., Breslow, J.L. : Synthesis, Intracellular Processing and Signal Peptide of Human Apolipoprotein E. J.Biol.Chem. 1984; 259, (8): 5495-5499.
15. Güldür, T., Bravo, E., Botham, K.M., Cantafora, A., Mayes, P.A.: Enhanced Hepatic Uptake and Metabolism of Desialylated Chylomicrons. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 1997; baskıda.
16. Filipovic, I., Buddecke, E. : Desialized Low Density Lipoprotein Regulates Cholesterol Metabolism in Receptor-Deficient Fibroblasts. Eur.J.Biochem. 1979; 101:119-122.
17. Filipovic, I., Schwarzmann, G., Mraz, W., Wiegandt, H., Buddecke, E. : Sialic Acid Content of Low Density Lipoproteins Controls Their Binding and Uptake by Cultured Cells. Eur.J.Biochem. 1979; 93:51-55.
18. Windler, E., Greeve, J., Levkau, B., Kolb-Bachofen, V., Daerr, W., Greten, H. : The Human Asialoglycoprotein Receptor is a Possible Binding Site for Low-Density Lipoproteins and Chylomicron Remnants. Biochem.J. 1991; 276: 79-87.
19. Terpstra, A.H.M., Woodward, C.J., Sanchez-Muniz, F.J. : Improved Techniques for the Separation of Serum Lipoproteins by Density Gradient Ultracentrifugation: Visualization by Prestaining and Rapid Separation of Serum Lipoproteins from Small Volumes of Serum. Anal.Biochem. 1981; 111: 149-157.

20. Beckering, R.E., Ellefson, R.D.: A Rapid Method for Lipoprotein Electrophoresis Using Cellulose Acetate as Support Medium. *Am.J.Clin.Path.* 1970; 53:84-88.
21. Laemmli, U.K. : Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
22. Assmann, G., Schriewer, H., Schmitz, G., Haegeler, E. O.: Quantification of High-Density Lipoprotein Cholesterol by Precipitation with Phosphotungstic Acid / $MgCl_2$. *Clin.Chem.* 1983; 29: 2026-2030.
23. Güldür, T., İleri, T.: İnsan ve Keçi Serumundaki Lipoproteinlerin Fosfotungstik Asit / $MgCl_2$ Presipitasyon Metodu ile Separasyonunun Karşılaştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Veteriner)*, 1996; 10, (2): 175-182.
24. Burstein, M., Scholnick, H.R., Morfin, R. : Rapid Method for the Isolation of Lipoproteins from Human Serum by Precipitation with Polyanions. *J.Lipid Res.* 1970; 11: 583-595.
25. Burnette, W.N. : "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal.Biochem.* 1981; 112:195-203.
26. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1979; 76, (9): 4350-4354.
27. Chan, L.: Apolipoprotein B the Major Protein Component of Triglyceride -Rich and Low Density Lipoproteins. *J.Biol.Chem.* 1992; 267, (36): 25621-25624.
28. Young, S.G.: Recent Progress in Understanding Apolipoprotein B. *Circulation.* 1990; 182, (5): 1574-1594.
29. Knott, T.J., Rall, S.C., Innerarity, T.L., Jacobson, S.F., Urdea, M.S., Levy-Wilson, B., Powel, L.M., Pease, R.J., Eddy, R., Nakai, H., Byers, M., Priestly, L.M., Robertson, E., Rall, L.B., Betsholtz, C., Shows, T.B., Mahley, R.W., Scott, J.: Human Apolipoprotein B: Structure of Carboxy -Terminal Domains, Sites of Gene Expression, and Chromosomal Localization. *Science.* 1985; 230: 37-43.
30. Kobata, A.: Glycobiology: An Expanding Research Area in Carbohydrate Chemistry. *Acc.Chem.Res.* 1993; 26, (6): 319-324.
31. Kornfeld, R., Kornfeld, S.: Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Ann.Rev.Biochem.* 1985; 54: 631-634.
32. Orekhov, A.N., Tertov, V.V., Mukhin, D.N.: Desialylated Low Density Lipoprotein-Naturally Occuring Modified Lipoprotein with Atherogenic Potency. *Atherosclerosis.* 1991; 86: 153-161.
33. Attie, A.D., Weinstein, B., Freeze, H.H., Pittman, R.C., Steinberg, D.: Unaltered Catabolism of Desialylated Low Density Lipoproteins in the Pig and in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochem.J.* 1979; 180:647-654.
34. Cooper, A.D., Coleman, D.: Chylomicron Remnant and Asialoglycoprotein Metabolism are Independent. *Lipids.* 1985; 20, (10):664-667.
35. Lis, H., Sharon, N.: Lectins as Molecules and as Tools. *Ann.Rev.Biochem.* 1986; 55: 35-67.
36. Shibuya, N., Goldstein, I.J., Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Pecters, B., Peumans, W.J.: The Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark Lectin Recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal / GalNAc Sequence. *J.Biol.Chem.* 1987; 262, (4): 1596-1601.