

## Übersicht

Aus dem Klinisch-Chemischen Laboratorium der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg

# Aspekte zur Pathobiochemie des Lipidstoffwechsels bei Lebererkrankungen, insbesondere bei Cholestase

H. Wieland, Giovannella Baggio, P. Müller, D. Seidel

## Plasma Lipoprotein in Liver Disease

H. Wieland, Giovannella Baggio, P. Müller, D. Seidel

### Zusammenfassung

Die allgemein bei Lebererkrankungen auftretenden abnormen Lipoproteine werden beschrieben, – besonderes Gewicht wird dabei auf die Cholestase gelegt. Das hierbei immer auftretende Lp-X wird, da es bis jetzt am besten charakterisiert ist, besonders eingehend beschrieben.

Die Zusammensetzung und Struktur und das sich daraus ergebende biologische Verhalten des Lp-X werden diskutiert, wie z. B. seine Rolle als Substrat für die LCAT oder Ergebnisse von Tierversuchen über seine Bedeutung für die Cholesterinsynthese unter der Cholestase oder über seine biologische Halbwertszeit. Vorstellungen über die Bildung des Lp-X aus Gallenbestandteilen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* werden beschrieben. Die Methoden zur Quantifizierung werden kritisch begutachtet.

Neben dem Lp-X findet man bei der Cholestase häufig eine Hypertriglyceridämie. Das dieser entsprechende Plasmalipoprotein ist ein relativ triglyzeridreiches Abbauprodukt der LDL<sub>1</sub>, das sich wegen eines Mangels an der für seinen Abbau notwendigen protaminunempfindlichen Lipoproteinlipase, die von der erkrankten Leber nicht ausreichend gebildet wird, im Plasma in der LDL<sub>2</sub>-Fraktion anhäuft. Es gibt deutliche Hinweise, daß es aus dem Stoffwechsel der Chylomikronen stammt.

Bei Lebererkrankungen, gleich welcher Art, können auch abnorme Lipoproteine in der VLDL- und HDL-Fraktion gefunden werden, deren Bedeutung für das Verständnis der Struktur von Lipoproteinen und der Protein-Lipidinteraktionen ausführlich diskutiert wird.

### Schlüsselwörter:

Lipoprotein, Lp-X, Cholestase, Lebererkrankungen, Cholesterinstoffwechsel

### Summary

The abnormal lipoproteins which eventually occur in the plasma of patients suffering from liver disease are described. Main emphasis is put on cholestasis. Lp-X, which is always present in this case is extensively dealt with since it is the best characterized abnormal lipoprotein so far.

The chemical composition and the structure together with the hereon depending biological behavior i.e. its role as a substrate for LCAT or results of animal-experiments concerning its importance for the cholesterol-synthesis in cholestasis or for its biological half-life are discussed.

Concepts about the formation of Lp-X from bile compounds *in vitro* and *in vivo* are developed. Methods for quantitation of Lp-X are critically evaluated.

Cholestasis is frequently accompanied by a marked hypertriglyceridemia. The corresponding plasmalipoprotein is a metabolic product of LDL<sub>1</sub>, relatively rich in triglycerides, which is accumulating because of a deficiency of the protamine-insensitive lipoproteinlipase which seems to be responsible for LDL<sub>1</sub>-degradation and is not produced in sufficient amounts by the diseased liver. It is accumulating in the LDL<sub>2</sub> fraction and is most probably originating from the catabolism of chylomicrons.

Regardless of the etiology of the liver disease there can be found abnormal lipoproteins in the VLDL- and HDL-fractions as well. The possible importance of these lipoproteins as a model for lipoprotein structure and protein-lipidinteractions in lipoproteins is discussed.

Key-words:

Lipoproteins, Lp-X, cholestasis, liver disease, cholesterinmetabolism

## I. Einleitung

Die überragende Bedeutung der Leber für den Lipidstoffwechsel bringt es mit sich, daß unterschiedlichste Störungen der Leberfunktion sich in Veränderungen des Lipidstoffwechsels ausdrücken können, die meistens ihren Niederschlag in abnormen Lipidkonzentrationen im Plasma finden. Da Lipide im Plasma nicht in physikalisch gelöster Form vorkommen können, sind sie an spezifische Transportproteine, Apoproteine, gebunden. Diese Protein-Lipid-Komplexe werden als Lipoproteine bezeichnet. Angesichts der Kenntnisse, die wir heute über den Lipidtransport im Plasma haben, können Triglyzerid- und Cholesterinstoffwechsel nicht mehr isoliert unter dem Gesichtspunkt der Biochemie und Physiologie dieser Lipidklassen allein betrachtet werden, sondern man muß der Tatsache Rechnung tragen, daß sie im Plasma nur in Form von Lipoproteinen vorkommen. Die gängigsten Einteilungsmethoden der Lipoproteine beruhen auf unterschiedlicher Dichte und elektrophoretischer Mobilität.

Unter Verwendung der analytischen Ultrazentrifuge hat man ein Dichtespektrum erstellt [31]. Mit zunehmender Dichte unterteilt man in: a. Chylomikronen, b. Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL), c. Low-Density-Lipoproteine (LDL) und d. High-Density-Lipoproteine (HDL).

Die einzelnen Dichteklassen können mit feiner abgestuften Grenzichten nach Bedarf noch weiter unterteilt werden, z. B. in LDL<sub>1</sub> und LDL<sub>2</sub>, bzw. in HDL<sub>1</sub>, HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>. In neuerer Zeit wurde eine Zentrifugationsmethode entwickelt, bei der sich die Lipoproteine längs eines im Rotor bereits vorhandenen Dichtegradienten auftrennen und nacheinander mit diesem eluiert werden können – die sog. Zonalzentrifugation.

Die am wenigsten aufwendige Methode zur analytischen Trennung der Lipoproteine ist die Lipoproteinelektrophorese [24]. Sie hat sich deshalb zu Recht für den klinisch-chemischen Gebrauch durchgesetzt. Die LDL wandern bei pH 8,6 in Agarose

in der Position der  $\beta$ -Globuline, HDL mit  $\alpha_1$ -Mobilität und VLDL zwischen beiden in  $\alpha_2$ -Position. Diese Mobilitäten haben eine zweite Nomenklatur für die Lipoproteine ergeben. Im Nüchternplasma gesunder Kontrollpersonen gelten folgende Gleichsetzungen: LDL =  $\beta$ -Lipoproteine, HDL =  $\alpha$ -Lipoproteine und VLDL = Prä- $\beta$ -Lipoproteine. Die Chylomikronen wandern nicht und behalten ihren Namen. Aus den typischen Verteilungsmustern lassen sich Rückschlüsse auf die Konzentration und unter Umständen auch auf die Art der im Plasma vorliegenden Lipoproteine ziehen. So konnte man mit Hilfe der Lipoproteinelektrophorese die Vielzahl unterschiedlicher primärer Hypercholesterinämien und Hypertriglyzeridämien auf sechs einfache unterschiedliche Muster reduzieren, die sich in ihrer Pathogenese, klinischem Bild, Therapie und Prognose erheblich voneinander unterscheiden. Daneben gibt es eine Vielzahl sekundärer Hyperlipoproteinämien, die oft eines der sechs Muster zeigen. Dyslipoproteinämien, die nicht in diese Muster passen, findet man hauptsächlich bei Lebererkrankungen. Es gibt kein Lipoprotein, das nur eine bestimmte Lipidklasse enthält. Alle Lipoproteine enthalten Triglyzeride, Cholesterin und Phospholipide, allerdings in sehr unterschiedlichen Mengen. Die Proteinkomponenten sind ebenfalls sehr heterogen.

## II. Das Plasmalipoproteinspektrum im Normalplasma

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Ausführungen seien hier kurz Eigenschaften, Stoffwechsel und Funktion der verschiedenen Lipoproteine erläutert (s. auch Abb. 1).

### 1. Chylomikronen

Die Chylomikronen sind mit einem Durchmesser, der bis zu 10 000 Å reichen kann, die größten Lipoproteine. Sie werden in der Mukosa des Dünndarms synthetisiert und bestehen zu 90 % aus mit der

Nahrung zugeführten Triglyzeriden, deren Vehikel sie darstellen. Sie transportieren auch Cholesterin, das der Nahrung, dem enterohepatischen Kreislauf und der Synthese der Darmwand entstammt, in Form von Cholesterin-Estern. Die Chylomikronen gelangen über den Ductus thoracicus in den Körperkreislauf und verlieren hier sehr schnell ihre Triglyzeride. An den Gefäßendothelien sind Enzyme lokalisiert, die aus lipoproteingebundenen Triglyzeriden Fettsäuren freisetzen, die sogenannten Lipoproteinlipasen. Dadurch werden die Chylomikronen zu Lipoproteinen höherer Dichte abgebaut, die dann Prä- $\beta$ -Mobilität entwickeln. Ein Teil der Chylomikronen wird direkt in die Leber aufgenommen. Diese Vorgänge sind ungefähr 10 Std. nach Nahrungsaufnahme beendet, im Plasma von Normalpersonen sind dann keine Chylomikronen mehr vorhanden.

## 2. Very-Low-Density-Lipoproteine (Prä- $\beta$ -Lipoproteine)

Die VLDL bestehen zum größten Teil aus endogenen Triglyzeriden und werden im Golgi-Apparat der Leberzelle zusammengesetzt. Ein kleiner Teil stammt vom Dünndarm [64] und aus dem Chylo-

mikronenabbau. Die VLDL-Fraktion stellt also eine hinsichtlich der Herkunft heterogene Lipoproteinfraktion dar. Sie ist ebenfalls Substrat für die Lipoproteinlipase und wird im Plasma zu Lipoproteinen höherer Dichte abgebaut. Ihre Größe beträgt 300–700 Å.

## 3. Low-Density-Lipoproteine ( $\beta$ -Lipoproteine)

Die LDL werden als cholesterinreiche Produkte des Chylomikronen- und VLDL-Metabolismus angesehen. Es ist noch strittig, ob und in welchem Umfang sie auch direkt von der Leber gebildet werden können. Jedenfalls wird das Körpercholesterin in Form von LDL der Leber zur Umwandlung in Gallensalze oder direkt zur Ausscheidung in die Galle angeboten. Die  $\beta$ -Lipoproteine bestehen zu 50% aus Cholesterin, das zu  $\frac{2}{3}$  mit Fettsäuren verestert ist. Die Partikel haben eine Größe von 150–200 Å.

## 4. High-Density-Lipoproteine ( $\alpha$ -Lipoproteine)

Die HDL transportieren die geringste Lipidmenge und bestehen zu 50% aus Protein. Ihre Größe beträgt nur noch 75–100 Å. Sie enthalten die meisten Phospholipide. Wahrscheinlich werden

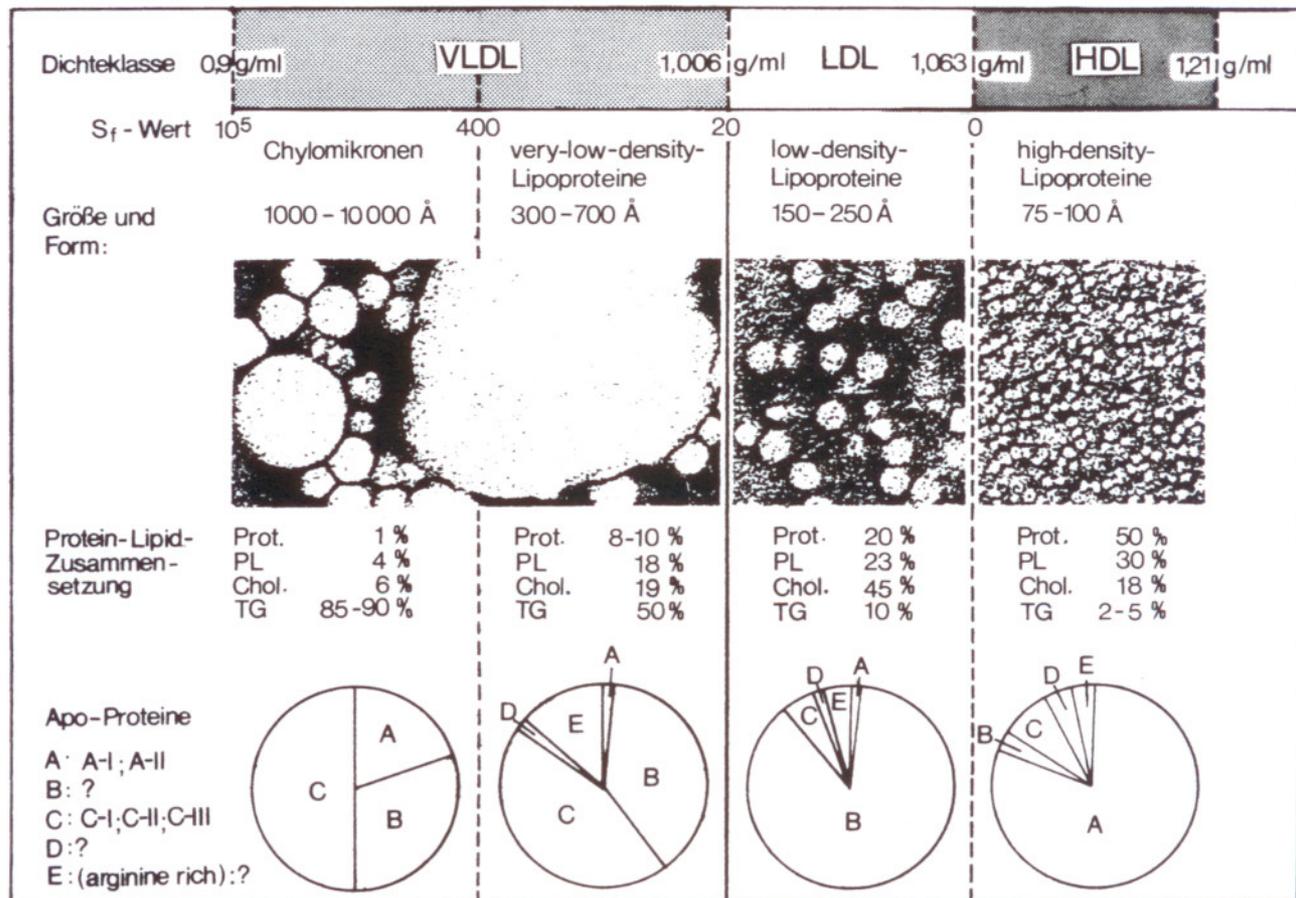


Abb. 1 Charakteristik der normalen Plasmalipoproteine. (Bei den Apo-Proteinen sind die Untereinheiten, soweit bekannt, angegeben).

sie von der Leber gebildet [76] und auch abgebaut [77], allerdings gibt es auch Hinweise für eine intestinale Synthese dieser Lipoproteinklasse. Cholesterin wird im Serum nur verestert, wenn es in Form von HDL vorliegt. Dabei sind die Phospholipide der HDL die Donatoren für die Fettsäuren, die von dem Enzym Lecithin : Cholesterin : Azytransferase (LCAT) übertragen werden [29].

### 5. Apolipoproteine

Die Dichteklassen, ebenso wie die elektrophoretischen Banden, enthalten nicht ausschließlich nur eine einzige Apoproteinkomponente. Die Hauptapoproteine der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lipoproteine bezeichnet man als Apo-A bzw. Apo-B. Die VLDL enthalten hauptsächlich Apo-B und Apo-C. Weiterhin kennt man Apo-E und Apo-D. Mit empfindlichen immunologischen und elektrophoretischen Methoden kann man in jeder Dichteklasse Apo-B, Apo-C und Apo-D feststellen [3].

Da es gelungen ist, Lipoproteine mit nur einem Apoprotein zu isolieren (Lp-A, Lp-B usw.), ergibt sich eine dritte Einteilungsmöglichkeit nach dem Proteinanteil. Diese erscheint biologisch am sinnvollsten. Die Apoproteine können zusammen mit ihren Lipidanteilen untereinander Komplexe bilden. VLDL und LDL<sub>1</sub> bestehen so zum größten Teil aus Komplexen von Apo-B mit Apo-C und Apo-E. Bei der enzymatischen Hydrolyse verarmen sie an Apo-C, das dann in der HDL-Fraktion zu finden ist, entweder assoziiert mit Apo-A oder selbständig als Lp-C. In der Postprandialphase soll das Lp-C wieder zu den neugebildeten Chylomikronen transferiert werden [33]. Die LDL-Fraktion besteht zum überwiegenden Anteil aus Lp-B. Es gibt Hinweise dafür, daß auch Lp-B unter bestimmten Stoffwechselbedingungen in eine niedrigere Dichteklasse gelangen kann und dann wieder mit Lp-C und Lp-E assoziiert [42]. Alle Lipoproteine, die Lp-B enthalten, gelten als besonders atherogen, mit Ausnahme der Chylomikronen.

Die Apoproteine lassen sich mit chromatographischen Methoden weiter auftrennen, z. B. Apo-A in A-I und A-II, Apo-C in C-I, C-II und C-III. Apo-B ist relativ wenig erforscht, da es in wäßrigen Lösungsmitteln unlöslich ist. Von A-I, A-II, C-I und C-III sind die Aminosäuresequenzen bekannt [7, 8, 36, 95, 96]. Apo-E enthält beim Menschen in relativ hohem Prozentsatz die Aminosäure Arginin und wurde deshalb auch ursprünglich als „arginine-rich-peptide“ bezeichnet [94]. Seine Bildung ist beim Schwein und Kaninchen durch Cholesterinfütterung induzierbar [13, 49].

Sicherlich sind bis jetzt nur einige der biologischen Funktionen der Apoproteine bekannt. So aktivieren C-I und C-II verschiedene Lipoproteinlipasen, die für den Abbau der Chylomikronen und VLDL verantwortlich sind [28].

Möglicherweise spielen A-I und Apo-D bei der

Aktivierung der LCAT eine Rolle [21, 42]. Für Apo-B, wahrscheinlich aber auch für andere Apoproteine, gibt es an der Zelloberfläche spezifische Rezeptoren, die den Abbau der entsprechenden Lipoproteine beeinflussen [17].

Die körpereigene Cholesterinsynthese wird in hohem Maße von der Menge extrazellulären Cholesterins, die in die Zelle gelangen kann, beeinflusst [10]. Unter physiologischen Bedingungen kann der Hauptanteil des Plasmacholesterins nur dann seine hemmende Wirkung ausüben, wenn es in Form Apo-B enthaltender Lipoproteine der Zelle angeboten wird. Diese Lipoproteine werden dann über den Proteinanteil selektiv an die Oberfläche gebunden. Nach enzymatischer Hydrolyse des Apo-B kann Cholesterin von Sterol-Carrier-Proteinen aufgenommen werden und so zu den Mikrosomen gelangen, wo es die Neubildung oder die Aktivität des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese, der HMG-CoA-Reduktase, hemmt [30].

Diese Befunde aus neuerer Zeit könnten erklären, warum beim stoffwechselgesunden Menschen die Plasmacholesterinkonzentration weitgehend unabhängig von der Cholesterinzufuhr mit der Nahrung ist. Die in der Postprandialphase an die Leber anflutenden Chylomikronen oder ihre Abbauprodukte würden über Apo-B an die Zelle gebunden, ihr Cholesterin an die Leber abgeben und somit eine Drosselung der Cholesterinsynthese herbeiführen.

Die Bedeutung der Apolipoproteine für Zusammensetzung, Struktur und Stabilität der Plasmalipoproteine läßt sich ermesen, wenn man abnorme Plasmalipoproteine untersucht. Alle nicht im Normalplasma vorkommenden Lipoproteine, die bisher bei Leberstörungen isoliert wurden, zeigten einen abnormen Proteinanteil. Dieser könnte entweder den weiteren Abbau des Lipoproteins schwerer gestalten, wenn nicht verhindern. Andererseits könnte er Teil eines Lipoproteins sein, das ein Produkt eines Stoffwechselnebenweges beim Mangel bestimmter Enzyme darstellt und deshalb akkumuliert.

Zunächst soll ein abnormes Plasmalipoprotein beschrieben werden, das bei der Cholestase auftritt und wahrscheinlich ein Produkt unphysiologischer, physikalisch-chemischer Gegebenheiten ist.

### III. Das Plasmalipoproteinspektrum bei Leberstörungen

*Flint* [23] beschrieb als erster eine Hypercholesterinämie bei Patienten mit Verschlußikterus. Die frühesten, in der Medizingeschichte beschriebenen Xanthome sind wahrscheinlich bei Patienten mit Cholestase beobachtet worden [37]. Seither versuchten verschiedene Arbeitsgruppen, die Veränderungen der Plasmalipide bei Patienten mit Leberstörungen genauer abzuklären [18, 20, 79, 100].

Die erhöhte Gesamtcholesterinkonzentration ist Ausdruck einer Erhöhung des unveresterten Anteils. Dadurch ist das Verhältnis von freiem Cholesterin zu Gesamtcholesterin erhöht. Bei nicht weiter eingeschränkter Leberfunktion bleibt die Konzentration der Cholesterinesterfraktion normal. Die Plasmatriglyzeridkonzentration ist bei der Cholestase nicht notwendigerweise verändert. Zudem kommt es zu einem Konzentrationsanstieg der Phospholipide. Unter diesen steigt das Lecithin am stärksten an. Man nimmt an, daß für den Phospholipidanstieg im Plasma allein eine Retention verantwortlich ist, da eine gesteigerte Synthese nicht sicher nachgewiesen werden konnte [72]. Den Phospholipiden wurde eine besondere Bedeutung für das Zustandekommen der Hyperlipoproteinämie zugeschrieben [1, 2, 25]. Sie sollen die strukturelle Stabilität der Lipoproteine steigern und damit das Cholesterinbindungsvermögen. Die Cholesterinsynthese ist bei Cholestase mit Sicherheit gesteigert. Dieser Befund soll jedoch später noch genauer behandelt werden.

Nachdem eine Verbindung zwischen dem Konzentrationsanstieg der Gesamtlipide und der  $\beta$ -Globuline entdeckt wurde [44, 45], beschrieb Gofman [31] als erster eine charakteristische Vermehrung der Lipoproteine mit einer Flotationskonstanten von  $S_f$  0–20 (entsprechend den LDL). Andere Gruppen fanden zusätzlich einen Konzentrationsabfall der HDL [26, 27, 34], auf dessen Bedeutung später auch noch genauer eingegangen werden soll.

Die HDL befinden sich in der Cohnfraktion IV–VI und stellen normalerweise die hauptsächlichen Lipoproteine dieser Fraktion dar. Russ u. Mitarb. [80] fanden jedoch in der Cohnfraktion IV–VI bei Patienten mit Cholestase eine starke Erhöhung von freiem Cholesterin und Phospholipiden, die dem Vorhandensein eines abnormen Lipoproteins zugeschrieben werden konnte, das zur Dichteklasse der LDL gehörte, aber nicht mit einem Antiserum gegen Apo-B reagierte. Ebenso beschrieb Switzer [99] bei Patienten mit Verschlussikterus in der LDL-Fraktion ein Lipoprotein, welches nicht mit Anti- $\beta$ -Lipoproteinserum reagierte, sich durch einen (für ein LDL) ungewöhnlich niedrigen Gehalt an Protein auszeichnete, jedoch einen sehr hohen Gehalt an Phospholipiden und freiem Cholesterin aufwies.

Die LDL-Fraktion von Patienten mit Cholestase reagiert mit Antiserum gegen HDL [46]. Dieser Umstand sowie die bekannte Tatsache des Phospholipidreichtums der  $\alpha$ -Lipoproteine verleiteten zu der Vermutung, es käme im Falle der Cholestase zu einer Verschiebung von  $\alpha$ -Lipoproteinen in die LDL-Fraktion [24]. Diese Vermutungen wurden durch eine komplette Fraktionierung der LDL-Fraktion von Patienten mit Cholestase und Reindarstellung des abnormen Lipoproteins mittels einer Kombination von Ultrazentrifugation, Cohn-

fraktionierung und Polyanionenpräzipitation durch Seidel u. Mitarb. widerlegt [54].

Das abnorme Lipoprotein wurde LP-X genannt. Mit seiner Synthese, Struktur und seinem Stoffwechsel soll sich der folgende Abschnitt befassen.

### A 1 Das abnorme Lipoprotein bei Cholestase (LP-X) (s. auch Abb. 2)

Die Protein-Lipid-Zusammensetzung des LP-X ist unabhängig von seiner Konzentration im Plasma. Sie zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Phospholipiden und Cholesterin aus. In der analytischen Ultrazentrifuge erhielt man einen  $S_f$ -Wert von 13–17 (LDL) [59]. Der Proteingehalt ist für ein LDL sehr niedrig, so daß das Phospholipid-Protein-Verhältnis mit 11 ungewöhnlich hoch ausfällt. Das LP-X erwies sich als gutes Antigen zur Antikörpererzeugung.

In den meisten üblichen Elektrophoresemedien wandert das LP-X geringfügig langsamer als die  $\beta$ -Lipoproteine. Dank seiner Größe von 300–700 Å und seinem geringen Proteingehalt wird es in Elektrophoresemedien mit starker Elektroendose (wie z. B. Agarose) von dieser kathodenwärts transportiert. Kein anderes Lipoprotein zeigt dieses für das LP-X typische Verhalten. Auf diesem Umstand beruht eine einfache klinisch-chemische Nachweis-

Dichteklasse:	1.035 -1.063 g/100 ml	
$S_f$ :	14 -16	
Elektrophoretische Mobilität:	Agargel:	Kathode
	Agarose,Papier	Anode
Protein-Lipid-Zusammensetzung:	Protein:	6%
	Cholesterin:	25%
	F. Cholesterin:	22%
	E. Cholesterin:	3%
	Triglyzeride:	3%
	Phospholipide:	66%
Apoproteine:	Albumin; C-I; C-II; C-III; D	
Größe und Form:	500-700 Å aggregiertes Vesikel	

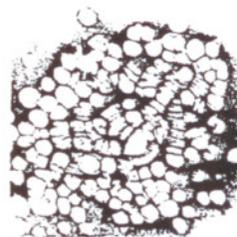


Abb. 2 Charakteristik des Lipoprotein-X.

methode für das LP-X [105]. Während es früher durch Immunpräzipitation in seiner typischen Position mit dem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden mußte, macht man sich heute den Umstand zunutze, daß Lipoproteine nach elektrophoretischer Trennung direkt im Gel mit Polyanionen und zweiwertigen Kationen präzipitiert werden können [92]. Dies hat den besonderen Vorteil, daß man zum Nachweis des LP-X auf das spezifische Antiserum verzichten kann. Es hat sich gezeigt, daß auch in den verschiedensten Tierspezies durch Unterbindung des Gallenganges LP-X erzeugt und durch diese Methode einfach entdeckt werden kann. Die LP-X-Erzeugung im Tierexperiment machte Untersuchungen über die Entstehung und den Stoffwechsel des LP-X möglich [89].

Isoliertes und reines LP-X reagiert nicht mit Anti-Humanserum, hingegen reagiert Anti-LP-X-Serum nicht nur gut mit isoliertem, reinen LP-X, sondern immer auch mit Albumin.

Nur partiell delipidiertes LP-X reagiert mit einem Anti-Albumin-Serum [83]. Dies bedeutet, daß LP-X Albumin enthält, das entweder unzugänglich für den Antikörper im Kern des Lipoproteins enthalten ist, oder daß die antigenen Seiten des Albumins im LP-X-Partikel maskiert werden. Der albuminfreie Proteinanteil des LP-X besteht aus Apo-C mit allen 3 C-Peptiden [83]. Wahrscheinlich ist nur C-I an der Oberfläche zu finden. Gesichert ist auch, daß sich Apo-D am Aufbau des LP-X beteiligt. Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte für die Beteiligung noch anderer, bis jetzt noch nicht näher charakterisierter Apo-Proteine [87]. Wahrscheinlich transportiert LP-X ein Isoenzym der alkalischen Phosphatase (E.C. No 3.1.3.1.) [11]. Es ist denkbar, daß noch weitere Enzyme auf dem LP-X lokalisiert sind. Darüber hinaus reagiert das Anti-LP-X-Serum mit dem Hepatitis-B<sub>s</sub>-Antigen [63], was allerdings nicht bedeutet, daß LP-X als Träger des Hepatitis-B-Antigens zu betrachten ist. Dieser Befund zeigt lediglich, daß am Aufbau beider Partikel neben anderen auch verwandte Proteine beteiligt sind.

Es ist bemerkenswert, daß das Albumin konstant 40% des Proteinanteils des LP-X ausmacht. Die Bedeutung des Albumins für die Struktur des LP-X konnte kürzlich von unserer Arbeitsgruppe erarbeitet werden, wobei auch wichtige Aufschlüsse über die Herkunft des LP-X gewonnen wurden [50].

Cholestase kann man definieren als Zustand, bei dem gallenpflichtige Substanzen in das Blut gelangen. LP-X mit seinen charakteristischen Eigenschaften konnte nie in der Galle nachgewiesen werden. Es ist also nicht als gallenpflichtige Substanz anzusehen, möglicherweise aber als ein Produkt des Zusammentreffens der Galle mit dem Blut. Es lag daher nahe, Galle mit Serum zu inkubieren und das Gemisch im LP-X-Test zu untersuchen. Dieses Gemisch enthielt LP-X, das sich mit den üblichen Me-

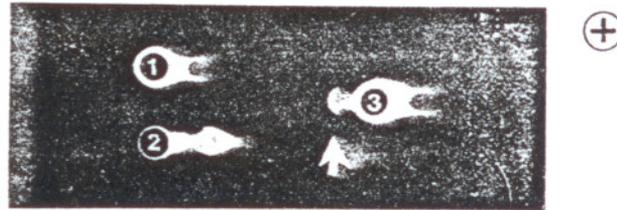


Abb. 3 Lipoproteinelektrophorese in 1% Agargel. Die Lipoproteinbanden wurden durch Polyanionenpräzipitation sichtbar gemacht.

- 1 = LP-X-negatives Serum
- 2 = Galle
- 3 = Gemisch von Serum und Galle
- ↑ = Typische Bande für LP-X

thoden isolieren ließ und nicht zu unterscheiden war von dem LP-X, isoliert aus dem Plasma von Patienten mit Cholestase [50] (s. auch Abb. 3).

Eine auf der Suche nach dem für die LP-X-Formation verantwortlichen Gallenbestandteil angefertigte Lipoproteinelektrophorese der Galle zeigt eine Bande in der Albuminposition, die immunologisch mit einem Antiserum gegen Albumin reagiert (s. auch Abb. 4). Die Immunpräzipitationsbande läßt sich mit Lipidfarbstoffen anfärben.

Aus der Galle läßt sich mit Hilfe der Ultrazentrifuge oder durch Polyanionenpräzipitation eine Fraktion isolieren, die sämtliche in der ursprünglichen Galle vorhandenen Lipide enthält. Sie hat eine den LDL entsprechende Dichte, wandert aber nicht in der Elektrophorese. Mit Anti-Human-Serum oder Antiserum gegen Apo-A, Apo-B oder Apo-C lassen sich keine immunologischen Reaktionen erzeugen. Inkubation dieser Fraktion mit Serum führt nicht zur Bildung von LP-X. Zugabe von Gallensalzen verändert die Eigenschaften der Gallenlipide drastisch. Wie in der nativen Galle wandern sie nun in der Elektrophorese in Albuminposition und zeigen eine immunologische Reaktion mit Anti-Albumin-Serum. Daraus kann geschlossen werden, daß die Lipide in der Galle in Form eines Lipoproteins vorliegen [50, 61, 91]. Partielle Delipidierung des isolierten Gallenlipoproteins mit N-Heptan führt zur Möglichkeit, den Proteinanteil im Lipoprotein zu untersuchen. Albumin scheint das Haupt-Apoprotein zu sein, das sich nun immunologisch nachweisen läßt. Apo-B konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Art der Lipide auf dem Gallenlipoprotein und ihr Verhältnis zueinander ist dieselbe wie in der Galle und im LP-X. Inkubation von Gallenlipoproteinen mit Gallensalzen und Serum führt zur vollständigen Umwandlung der ersten in LP-X. Als Gallenbestandteile sind also das Gallenlipoprotein und Gallensalze zur Bildung von LP-X notwendig.

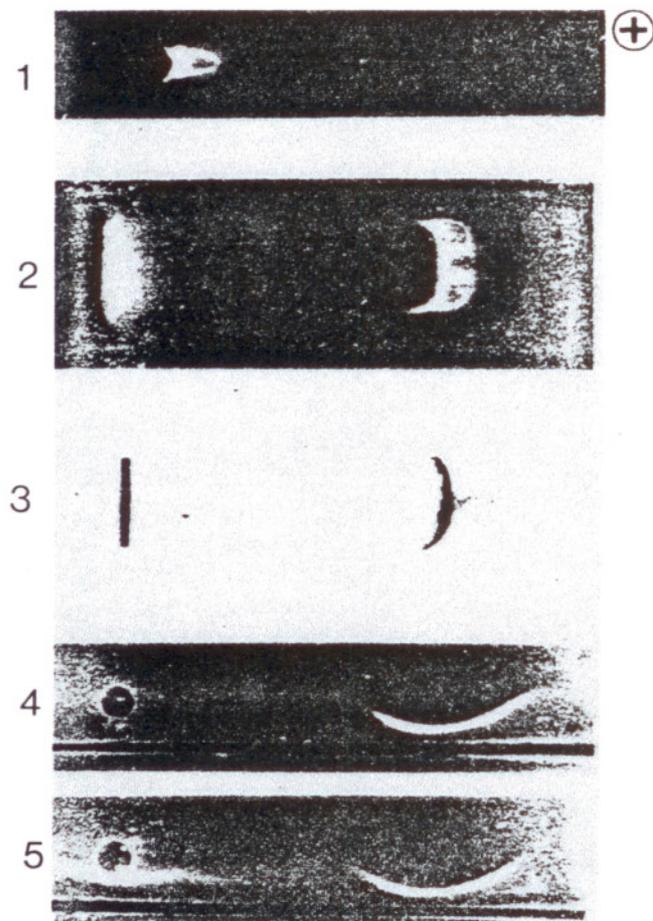


Abb. 4 Agar- und Agaroselektrophorese von Galle.  
 1 = 1% Agarelektrophorese. Die Lipoproteinbande wurde durch Polyanionenpräzipitation sichtbar gemacht.  
 2 = Agaroselektrophorese. Die Lipoproteinbande wurde durch Polyanionenpräzipitation sichtbar gemacht.  
 3 = Agaroselektrophorese. Die Lipoproteinbande wurde durch Sudanschwarzfärbung dargestellt.  
 4 = Immunelektrophorese von Galle gegen Anti-Albumin-Serum vom Kaninchen.  
 5 = Immunelektrophorese von Galle gegen Anti-Human-Serum vom Kaninchen.

Mischen von Galle mit VLDL, LDL, HDL oder isolierten Gammaglobulinen führt nicht zur Bildung von LP-X. Mischung von Galle und Albumin bewirkt die Bildung eines Lipoproteins mit derselben elektrophoretischen Mobilität wie LP-X, das aber keine Reaktionen mit Antiseren gegen die Apoproteine zeigt, also im Gegensatz zum LP-X nicht mit Anti-C reagiert, aber wie dieses auch nicht mit Anti-Albumin-Serum. Wie bei LP-X und dem Gallenlipoprotein kommt die Albuminkomponente aber nach partieller Delipidierung zum Vorschein. Radioaktiv markiertes Albumin war nach Zugabe zur Galle in diesem LP-X-artigen Partikel zusammen mit unmarkiertem Albumin in demselben Verhältnis nachzuweisen wie in der dann Lipid-freien

Galle. Dies spricht für eine echte Inkorporation des Albumins in das neu gebildete LP-X.

LP-X mit nur Albumin als Apo-Protein ist größer als das von Patienten mit Cholestase und hat ein höheres Protein-Lipid-Verhältnis. In isoliertem Zustand ist es weniger lange haltbar. Zugabe von Serum, VLDL oder HDL führt zur Verkleinerung des Partikels und zu einer Abnahme des Anteils an Protein. In allen Fällen werden durch eine solche Zugabe hauptsächlich die drei C-Peptide übertragen, was zu einer Stabilisierung des Partikels führt.

Es ist theoretisch sehr interessant, daß keines der Haupt-Apoproteine wie Apo-A oder Apo-B übertragen wird. Bildet doch Apo-C besonders zusammen mit Apo-B die Lipoproteinkomplexe, die den Hauptanteil des Triglyzeridtransports übernehmen. Das LP-X enthält aber eine auffällig geringe Menge an Triglyzeriden, zu denen die C-Peptide eine hohe Affinität zu haben scheinen. In welcher Form die C-Peptide ausgetauscht werden, ist nicht bekannt. Die HDL-Fraktion reichert sich während der lipolytischen Prozesse im Plasma nicht mit Phospholipiden an. Da sie aber das Apo-C während dieser Phase aufnimmt, ist es unwahrscheinlich, daß dieses als Phospholipid-Proteinkomplex transferiert wird. Man nimmt daher einen Austausch in Form von Apoproteinen an [17].

Als Serumbestandteil genügt demnach schon Albumin zur Überführung des Gallenlipoproteins in einen LP-X-ähnlichen Partikel. Die Menge des dafür notwendigen Albumins hängt von der Gallensalzkonzentration der Galle ab. In jedem Fall ist es möglich, alles vorliegende Gallenlipoprotein in diese Art LP-X zu verwandeln.

Man kann sich die Bildung des LP-X unter der Cholestase demnach folgendermaßen vorstellen: Es kommt unter anderem zu einem Reflux des Gallenlipoproteins mit Gallensalzen. Wenn diese Komponenten mit Albumin in Berührung kommen, entsteht LP-X mit Albumin als Apoprotein, das dann Apo-C aufnimmt und sich durch Kleinerwerden stabilisiert. Kürzlich ist es uns gelungen, LP-X aus Albumin und einer Cholesterin:Lezithin-Emulsion nach Ultraschalldispersion herzustellen, also ohne Beteiligung von Gallensalzen. Diese Art der Synthese entspricht jedoch sicher nicht den Verhältnissen *in vivo*. Hier spielen offenbar die Gallensalze als Emulgatoren eine wichtige Rolle. Die gallensalzfreie Synthese ist jedoch von Bedeutung für die Erforschung von Protein-Lipid-Interaktionen. Das von uns synthetisierte LP-X ist das erste Lipoprotein, das aus seinen Bestandteilen vollständig zusammengesetzt werden konnte und dabei dem natürlich vorkommenden Lipoprotein identische Eigenschaften erhielt.

Zugabe von steigenden Mengen von Gallensalzen führt zu einer Veränderung der physiko-chemischen Eigenschaften des LP-X. Es wandert dann in der Agarelektrophorese nicht mehr zur Kathode, son-

den anodenwärts, ist also im LP-X-Test nicht mehr nachzuweisen. In der Lipoproteinelektrophorese wandert es wie das Gallenlipoprotein in nativer Galle oder nach Isolierung und Zugabe von Gallensalzen in der Albuminposition. Die Immunreaktivität gegen Anti-Albumin-Serum kommt, wie auch beim Gallenlipoprotein, nach Gallensalzzugabe zum Vorschein. Dies wird wahrscheinlich verursacht durch Bindung der Gallensalze an LP-X, die die Ladung verändern und die Ummantelung der antigenen Determinanten des Albumins durch Phospholipide auflockern. Zugabe eines Überschusses an Albumin, das eine höhere Affinität zu Gallensalzen hat als LP-X, führt zu einer völligen Aufhebung dieses Effektes: LP-X wandert wieder zur Kathode; Albumin ist nicht mehr an der Oberfläche nachweisbar. Es empfiehlt sich daher, zum Nachweis des LP-X in Seren mit hohen Gallensalzkonzentrationen, wie z. B. in denen von Patienten mit länger andauernden Cholestasen, dieses Albumin zuzusetzen, um auch ein physiko-chemisch umgewandeltes LP-X sicher erfassen zu können.

Durch Implantation des Ductus choledochus in die Vena cava inferior ließ sich LP-X auch in vivo beim Hund produzieren [50], was für die Richtigkeit unserer Vorstellungen über die Herkunft des LP-X spricht.

## A 2 Struktur des LP-X

Das LP-X erscheint nach elektronenoptischen Untersuchungen als runder Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 300–700 Å mit starker Tendenz zur Aggregation und Scheibenbildung [84], sog. Rouleauxformation. Dies ist kein für das LP-X typischer Befund. Ähnliche Strukturen kann man auch beobachten, wenn man isolierte Apoproteine Phospholipiddispersionen zusetzt [35]. Sie lassen sich ebenfalls im Plasma von cholesteringefütterten Meerschweinchen [81] und sowohl in der LDL- als auch HDL-Fraktion von Patienten mit LCAT-Deficiency (s. unten) beobachten. Da man sie aber bei Mäusen mit Choledochusligation nicht in den Leberzellen gefunden hat, wohl aber im Disseschen Raum, nimmt man an, daß sie im Plasma entstehen [98].

Da wasserlösliches Phosphorwolframat ebenso wie Succinylanhydrid in das Innere des Partikels dringen konnten, nimmt man an, daß es sich um Vesikel handeln könnte [38]. Kleinwinkelröntgenstrahl-Streuungsuntersuchungen lassen das Vorhandensein einer Bilayerstruktur vermuten, in der die polaren Gruppen der Phospholipide sich außen befinden und um 45 Å auseinanderstehen. Die Fettsäureketten und Cholesterin sind an der Innenseite der Membran dem Vesikelinhalt zu angeordnet. Mit Ferritin lassen sich keine SH-Gruppen an der Oberfläche nachweisen. Zugabe von Ammoniummolybdat zerstört die Partikel. Dies sowie der immuno-

logische Nachweis von Apoproteinen lassen darauf schließen, daß sich an der Oberfläche Proteine befinden. Entsprechend der Lokalisation der Phospholipide an der Oberfläche läßt sich der Partikel durch Phospholipasen zerstören [85].

Über den genauen Sitz des Albumins ist noch nichts bekannt. Zugabe von Gallensalzen führt zu einer Größenzunahme des Partikels, wenn man elektronenoptische Beobachtungen mit dem Positivkontrastverfahren bei niedrigem pH zugrunde legt. Albumin ist dann an der Oberfläche nachweisbar. Immunologisch hat man an der Oberfläche bis jetzt C-I und Apo-D entdecken können. Der von Picard [69] berichtete Gehalt an Apo-A ist wahrscheinlich auf eine Kontamination des verwendeten Anti- $\alpha$ -Lipoproteinserums mit Anti-D zurückzuführen. In der Polyacrylamidelektrophorese sieht man C-I, C-II und C-III in seinen polymorphen Formen. Hinweise für Apo-E an der Oberfläche haben sich bisher nicht ergeben [106].

## A 3 LP-X als Substrat für die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

Ein dem LP-X wahrscheinlich sehr ähnliches Lipoprotein findet man in der LDL-Fraktion von Patienten, die an einer sehr seltenen familiären Stoffwechselkrankheit leiden [93, 101], die hauptsächlich in Skandinavien auftritt: einem erbten Mangel an jenem Enzym, das die Veresterung des Cholesterins im Plasma an den HDL katalysiert, der Lecithin : Cholesterin : Acyltransferase (LCAT). Das Vorliegen einer Cholestase oder Leberstörung konnte bei diesen Patienten bisher nicht nachgewiesen werden. Andererseits wird LCAT in der Leber gebildet, so daß eine schwere Lebererkrankung zum Absinken der Aktivität im Plasma führt (Estersturz!).

Bei Cholestase werden häufig normale oder sogar erhöhte Aktivitäten gemessen. Daher ist ein Mangel an LCAT sicher nicht die Ursache für das Auftreten des LP-X in diesem Falle. Theoretisch müßte das LP-X mit seinem dem der HDL ähnlichen Cholesterin-Phospholipidverhältnis ein gutes Substrat für dieses Enzym sein, da zudem das Cholesterin fast vollständig in unveresterter Form vorliegt. Inkubation mit Normalserum führt nach Patsch u. Mitarb. [65] und Ritland u. Gjone [75] zu einer Verminderung des Gehaltes an zugesetztem LP-X. Dies wurde einmal durch Quantifizierung des LP-X im Serum nach Elektrophorese, die eine unveränderte Mobilität des LP-X voraussetzt, gemessen oder im Muster der Zonalzentrifuge festgestellt. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß LP-X von LCAT abgebaut wird. In unserem Laboratorium sind wir zu anderen Ergebnissen gekommen. LP-X dient nicht nur nicht als Substrat für die LCAT [105], sondern Zugabe von LP-X zu normalem Serum hemmt die initiale Vereste-

rungsrate, wenn man das Entstehen von Cholesterinestern mit der doppelenzymatischen Cholesterinmethode mißt. Nach *Morriset* [58] können nur in sich sehr bewegliche Moleküle, wie HDL, als Substrat für LCAT dienen. Nach gängigen Vorstellungen über die Struktur von Lipoproteinen befinden sich Proteine, Phospholipide und Cholesterin außen am Molekül, Cholesterinester und Triglyzeride innen. Damit nun das Enzym zu den beteiligten Lipiden gelangen kann, müßten diese eine gewisse Beweglichkeit aufweisen können. Dies ist beim HDL schon bei 25° C der Fall. Das LP-X ist im Gegensatz ein sehr starrer Partikel und zeigt bei Erhitzung bis 60° C keine nennenswerte Beweglichkeitszunahme seiner Lipide.

#### A 4 Die Bedeutung des Nachweises des LP-X als klinischer Test

Die Tatsache, daß LP-X nie in Seren von Patienten auftritt, die keine Cholestase haben (außer bei LCAT-Deficiency), legte es nahe, in seinem Nachweis einen aussagekräftigen Test für das Vorliegen einer Cholestase zu suchen. Die Erwartungen haben sich voll erfüllt. Hierzu wurden in den letzten Jahren in den verschiedensten Ländern, unabhängig voneinander, eine Reihe gut dokumentierter Untersuchungen angestellt [22, 51, 57, 70, 71, 73, 86], um die Treffsicherheit des LP-X-Testes zu untersuchen. Alle Ergebnisse zeigen deutlich eine bei einem klinisch-chemischen Test selten hohe Treffsicherheit, wenn als Kriterium ein klarer histologischer Befund eingesetzt wird. Als einziger kam *Vergani* [103] zu dem Ergebnis, das LP-X sei kein guter klinisch-chemischer Test, um das Vorliegen einer Cholestase festzustellen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden geben jedoch einigen Anlaß zur Kritik: Es wurde versucht, das LP-X mit einem Antiserum zu entdecken, das mit Normalserum absorbiert worden war. Dies setzt das Vorliegen einer spezifischen antigenen Determinanten auf der Oberfläche des LP-X voraus, die im Normalserum nicht vorhanden ist. Es soll nicht angezweifelt werden, daß es diese geben könnte. Sie muß aber nicht notwendigerweise in jedem Falle vorliegen. Die immunologische Reaktion des LP-X wird von den meisten Untersuchern auf das Vorhandensein von Apo-C an der Oberfläche des LP-X zurückgeführt. Da Apo-C im Normalserum vorhanden ist, wurde Anti-C aus dem Anti-LP-X-Serum heraus absorbiert. Ein LP-X ohne spezifische Determinante, mit nur C-I an der Oberfläche, würde nicht entdeckt werden. Wenn LP-X immer diese spezifische Determinante enthielte, dann müßte man zu seinem Nachweis keine Immunelektrophorese benutzen, die die geringste Sensitivität zur Entdeckung des LP-X hat [67], sondern die wesentlich einfachere und sensitivere Immundiffusion in Agar. Ferner muß man bemerken, daß die Kom-

bination zweier unspezifischer Parameter wie Bilirubin und alkalische Phosphatase, die von *Vergani* als Kriterien für Cholestase angesehen werden, nicht unbedingt zu einer spezifischeren Aussage bezüglich des Vorliegens einer Cholestase führt.

Der große Vorteil des LP-X-Testes liegt in seiner Ja-Nein-Aussage und in der Tatsache, daß man nur 10 µl Serum zur Analyse braucht. Bis jetzt gibt es noch keinen sicheren laborchemischen Parameter zur Differenzierung zwischen intrahepatischer und extrahepatischer Cholestase. Ein bestimmtes Isoenzym der Gamma-Glutamyltransferase scheint u. a. bei extrahepatischer Cholestase vermehrt im Serum vorzukommen, ist aber auch bei nichtcholestatischen Lebererkrankungen erhöht [51]. Zusammen mit dem LP-X-Test als besonders sensitivem und exaktem Nachweis der Cholestase ergeben sich hier vielversprechende Möglichkeiten. Diesbezügliche Untersuchungen werden z. Z. in unserem Laboratorium unternommen.

#### A 5 Tiermodelle für Studien zur Synthese des LP-X

Bis jetzt wurde mit Erfolg die Erzeugung des LP-X durch Unterbindung des Ductus choledochus in Mäusen, Ratten und Hunden versucht [59, 89, 98]. Zumeist trat es in der LDL-Fraktion auf und hatte eine Protein-Lipid-Zusammensetzung, ähnlich der des menschlichen LP-X. Berichten in der Literatur zufolge konnte es niemals beim Schwein erzeugt werden [16].

Da wir durch Inkubation von Menschengalle mit Schweineserum und Schweinegalle mit Menschenserum jedesmal LP-X erzeugen konnten, war es erwiesen, daß die für die Bildung des LP-X notwendigen humoralen Voraussetzungen beim Schwein gegeben sind. Dies wurde bestätigt durch die erfolgreiche Inkubation von Galle und Serum vom Schwein. Ebenso ist es uns gelungen, beim Göttinger Minischwein durch Unterbindung des Ductus choledochus LP-X nach 7 Tagen im Serum nachzuweisen. Nach Implantation des Gallenganges in die Vena renalis dextra trat es bei derselben Spezies nach 3 Tagen im Serum auf. Das späte Auftreten nach Ligation mag an anatomischen Besonderheiten (Septenleber) oder an dem ausnehmend hohen Gallensalzgehalt der Schweinegalle liegen. Es ist bekannt, daß in den Gallenblasen von Schweinen fast niemals Gallensteine gefunden werden, obwohl die Schweine ja erwünschtermaßen „übergewichtig und fruchtbar sind (fat and fertile)“. Das LP-X gehört beim Schwein der HDL-Fraktion an.

#### A 6 Methoden zur Quantifizierung des LP-X

In den letzten 3 Jahren wurden fünf Methoden zur Quantifizierung des LP-X entwickelt. Die erste

[48] beruht auf dem Ausstanzen der Area, die sich kathodenwärts vom Startpunkt der Elektrophorese befindet, nach dem Lauf und der Bestimmung ihres Gehaltes an Phosphor, der dann Rückschlüsse zulassen soll auf die LP-X-Konzentration des untersuchten Serums. Die Hauptnachteile der Methode beruhen auf der umständlichen und störanfälligen Phosphorbestimmung und der Gefahr, nicht das gesamte LP-X auszustanzen, da man nur seinen vermutlichen Lagepunkt kennt. Hieraus resultieren eine zu geringe Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Methode.

Bei der zweiten Methode [74] wird die Menge des dem zu untersuchenden Serum zugegebenen radioaktiven Cholesterins im LP-X bestimmt. Dieses wird nach 4stündiger Äquilibration elektrophoretisch getrennt und mit nachfolgender Polyanionenpräzipitation sichtbar gemacht, wie von uns beschrieben [92]. Da nur relative Mengen bestimmt werden, entfällt hierbei die Notwendigkeit einer exakt definierten Auftragsmenge. Der Nachteil dieser Methode liegt im Arbeiten mit radioaktiven Substanzen ebenso wie in ihrer Aufwendigkeit und Zeitdauer.

Die dritte Methode [41] ist eine quantitative Immunelektrophorese nach *Laurell* unter der Benutzung von Anti-C-Serum. Die B:C-Komplexe werden mit Anti-B vorab präzipitiert oder in einem Anti-B-haltigen Agarosestreifen, durch den das Serum wandern muß, abgefangen. Diese Methode zeigt eine sehr hohe Sensitivität, und es sind nur geringe Serummengen notwendig. Ihr Nachteil liegt in der Notwendigkeit des Anti-C-Serums, das nicht käuflich erhältlich ist und in einem stabilen Standard, der vorhanden sein muß. Zudem besteht die Gefahr einer Überschätzung des LP-X-Gehaltes im Serum, da das LP-C der HDL-Fraktion mitgemessen wird.

Im Elutionsdiagramm der Zonalzentrifuge zeigt die LDL-Fraktion eines Patienten mit Cholestase nicht wie normalerweise einen, sondern zwei oder mehrere peaks, von denen einer dem LP-X entspricht. Auf der quantitativen Isolierung dieses peaks beruht die vierte Methode [65]. Die Nachteile beruhen auf der Notwendigkeit einer weit über der Norm liegenden Serummenge, die für klinisch-chemische Untersuchungen nicht vertretbar ist, und einer apparativen Ausstattung, die nur wenige Forschungslaboratorien besitzen. Ferner sollte die isolierte Lipoproteinfraktion jedesmal genau charakterisiert werden, um das ausschließliche Vorliegen von LP-X zu beweisen.

Die fünfte Methode [62] wurde von unserer Arbeitsgruppe entwickelt und beruht auf der densitometrischen Messung der präzipitierten LP-X-Bande nach elektrophoretischer Auftrennung. Ihr Vorteil liegt in der hohen Sensitivität und Spezifität. Die notwendige Standardisierung des Systems läßt sich einfach durch Filter ermöglichen. Sie stellt die

schnellste Methode von allen dar. Es müssen allerdings genau definierte Mengen aufgetragen werden. Außerdem ist ein geeigneter Densitometer erforderlich.

#### A 7 Stoffwechsel des LP-X

Mit Hilfe des von uns entwickelten LP-X-Testes mit nachfolgender Quantifizierung war es möglich, die Konzentration von LP-X im Serum von Tieren zu verfolgen und die biologische Halbwertszeit zu bestimmen [89]. Nach Ligation des Ductus choledochus erscheint das LP-X außer beim Schwein innerhalb der ersten 20 Std. im Plasma. Das Auftreten wird durch vorherige Cholezystektomie beschleunigt [74]. Einer Periode deutlichen Anstiegs folgt eine Abnahme des an der Kathodenseite nachweisbaren Lipoproteins. Diese Abnahme bedeutet nicht, daß in dieser Phase der Abbau des LP-X schneller abläuft als seine Produktion. Wie wir vorher gesehen haben, verursachen Gallensalze in erhöhter Konzentration – und ihre Konzentration steigt ja unter der Cholestase –, daß LP-X nicht mehr zur Kathode wandert. Dieses Phänomen wird auch von freien Fettsäuren hervorgerufen [88]. Inkubiert man LP-X mit Postheparinplasma und mißt in gewissen Zeitabständen die Konzentration des Lipoproteins an der Kathode, so nimmt diese stetig bis zum vollständigen Verschwinden ab. Zugabe von Albumin bewirkt zu jedem Zeitpunkt eine vollständige Wiederherstellung der LP-X-Konzentration an der Kathode. Inkubiert man Postheparinplasma ohne Zusatz von LP-X bei 37°C für 3 Stunden und fügt dann isoliertes LP-X hinzu, verändert dieses unmittelbar seine Mobilität. An der Kathode ist kein Lipoprotein nachweisbar. Zugabe von Albumin bringt LP-X sofort wieder zum Vorschein an seiner üblichen Position. Studien über den Abbau des LP-X im Postheparinplasma müssen daher mit großer Vorsicht interpretiert werden.

Welche Organe nun wirklich für den LP-X-Abbau in Frage kommen, ist noch nicht geklärt. Nach experimenteller Erzeugung einer Cholestase wurden in den Kupfferschen Sternzellen mit dem Elektronenmikroskop LP-X-artige Partikel beobachtet [98]. Daher muß man auf eine Beteiligung des RES schließen.

Injektionen von LP-X in nicht operierte homologe Kontrolltiere ergaben eine Halbwertszeit von 10 Std. für die Ratte und 37 Std. für den Hund [89] – Werte, die auch für normale Plasmalipoproteine beschrieben worden sind.

#### B Regulierung der Cholesterinsynthese bei der Cholestase; mögliche wichtige Rolle des LP-X

Zur Abklärung der Hypercholesterinämie bei der Cholestase unternahmen *Byers* u. *Friedman* 1951 [12] folgende Versuche: Sie unterbanden bei Ratten

den Ductus choledochus und maßen den Anstieg des Plasmacholesterinspiegels. Aus vorherigen Bestimmungen des Gallenflusses und des Cholesteringehaltes der Galle berechneten sie, daß Gallenrückstau allein nicht für die Hypercholesterinämie verantwortlich sein könne. Der Gehalt der Leber an Cholesterin war nach Obstruktion weder erhöht noch erniedrigt, so daß kein Cholesterin aus der Leber herausgepreßt worden sein konnte, aber auch nicht akkumuliert war. Anastomosierung des Gallenganges mit der Vena cava inferior führte zu einer Hypercholesterinämie, die aber nicht die Werte bei Obstruktion erreichte. Heute wissen wir, daß Ableitung der Galle den Gallenfluß und die Cholesterinsynthese steigert. Ein Teil der Hypercholesterinämie der ersten Versuchsreihe war sicher auf das Auftreten von LP-X zurückzuführen, in der zweiten Versuchsreihe wahrscheinlich sogar der überwiegende Teil.

Eviszeration der Ratten führte zu keinem Ansteigen des Plasmacholesterinspiegels, aber auch zu keinem Absinken, trotz des Cholesterinverlustes mit der Galle. Die endogene Synthese machte also den Verlust wett. Wurde zusätzlich der Gallengang unterbunden, stieg der Plasmacholesterinspiegel wieder an, aber nicht so hoch wie bei Gallengangsunterbindung bei intaktem Darm, wahrscheinlich weil der Beitrag der intestinalen Cholesterinsynthese zur Plasmacholesterinkonzentration ausgefallen war.

Aus diesen Versuchen läßt sich folgendes ableiten: Bei Cholestase ist die Cholesterinsynthese gesteigert, Ableitung der Galle in den Kreislauf führt trotz ansteigender Gallensalzkonzentration zu einer gesteigerten Cholesterinsynthese ebenso wie Ausschaltung des Darms. Das vermehrt synthetisierte Cholesterin wird nicht in der Leber angesammelt. Nach Weis u. Dietschy [104] ist bei der Cholestase deshalb die Cholesterinsynthese gesteigert, weil keine Chylomikronen mehr gebildet werden können, bedingt durch einen Mangel an Gallensalzen. Es war von *Bhattachary* u. *Siperstein* gezeigt worden [10], daß intestinale Lipoproteine die Cholesterinsynthese in der Leber hemmen können. Wenn diese nicht gebildet werden, könnte die endogene Synthese als Folge ansteigen.

Neu synthetisiertes Cholesterin wird von der Leber hauptsächlich in Form von VLDL, aber wahrscheinlich auch als LDL [68] an das Plasma abgegeben. Die hepatische Cholesterinsynthese ist bei normalem LDL-Katabolismus ohne Einfluß auf den Plasmacholesterinspiegel [17]. Bei Cholestase wird meistens eine erniedrigte Konzentration von Apo-B gefunden [10], was bei gesteigerter Cholesterinproduktion ein Hinweis dafür sein könnte, daß der LDL-Katabolismus normal funktioniert. Es ist aber ebenso denkbar, daß das neu synthetisierte Cholesterin in Form des Gallenlipoproteins von der Leber abgegeben wird und im Plasma als LP-X imponiert. Da LP-X kein Apo-B enthält, wäre es nicht in

der Lage, sein Cholesterin direkt an die Zelle abzugeben und damit die Cholesterinsynthese zu hemmen. Um diese Beziehung zu prüfen, haben wir Ratten menschliche LDL infundiert und in einer nachfolgenden Leberperfusion die Cholesterinsynthese, ausgedrückt als die Einbaurrate von radioaktiv markiertem Azetat in das Lebercholesterin, gemessen [47]. LDL bewirkten eine deutliche Hemmung, während Infusion von LP-X keinen Einfluß auf die Cholesterinsyntheseleistung der Leber hatte. Die erniedrigte Konzentration von Apo-B wäre entweder auf eine verminderte VLDL-Synthese oder auf einen beschleunigten Abbau zurückzuführen und kann als Ursache oder Teilursache der gesteigerten Cholesterinsynthese bei Cholestase in Betracht gezogen werden. Eine andere Erklärung für die gesteigerte Cholesterinsynthese bei der Cholestase wäre die Annahme eines intrazellulären Defektes bei der Feedback-Regulation. Hierbei könnte die Leber den Ausscheidungsmechanismus für neu synthetisiertes Cholesterin in Form von VLDL aufrecht erhalten.

Setzt man nur beim Mittellappen der Rattenleber eine Cholestase, hat man im Plasma die Gegebenheiten der Cholestase, kann aber den Einfluß dieser Gegebenheiten auf nicht-obstruiertes Lebergewebe mit dem auf obstruiertes Lebergewebe vergleichen [14]. In beiden Geweben steigt die Cholesterinsynthese, allerdings im obstruierten wesentlich stärker. Der Anstieg auch im nicht-obstruierten Lebergewebe könnte als ein Hinweis für einen humoralen Faktor in Frage kommen, der zur Erhöhung der Cholesterinsynthese führt und bei Cholestase im Plasma auftritt. Da HDL in isolierten Rattenhepatozyten zur Steigerung der Cholesterinsynthese führen und das Cholesterin:Phospholipidverhältnis im LP-X von allen Plasmalipoproteinen dem der HDL am ähnlichsten ist, könnte LP-X als dieser humorale Faktor in Frage kommen. Infusion von intestinalen Lipoproteinen führt zu einer Hemmung der Cholesterinsynthese im nicht-obstruierten Lebergewebe, aber zu keiner nennenswerten im obstruierten. Hiernach müßte also der Fehler in der Feedback-Hemmung auf intrazellulärer Ebene zu suchen sein.

Es ist denkbar, daß das Gallenlipoprotein bei Cholestase vermehrt gebildet wird und daß hierzu direkt das aus dem LDL-Abbau stammende Cholesterin verwendet wird, das dann nicht in den Mikrosomen akkumuliert und die Cholesterinsynthese hemmt. Zur Klärung der Pathogenese der gesteigerten Cholesterinproduktion bei Cholestase erscheint es demnach notwendig, den VLDL- und LDL-Turnover in dieser Situation genauer zu bestimmen. Ferner müßte geklärt werden, ob neu synthetisiertes Cholesterin sofort in LP-X eingebaut wird, oder erst in VLDL oder LDL und nach dessen Abbau im LP-X enthalten ist. Das erstere erscheint uns leichter erklärlich.

### C Hypertriglyzeridämie bei Leberstörungen

Die Erhöhung der Plasmatriglyzeride bei der alkoholischen Leberschädigung ist seit langem bekannt [9]. Daß es, unabhängig vom Einfluß des Alkohols, bei Patienten mit Leberdysfunktion zu einer deutlichen Hypertriglyzeridämie kommen kann, fand erst in den letzten Jahren Beachtung. Klinische Untersuchungsreihen [4, 19, 39, 66] wiesen zuerst darauf hin, daß auch die Hypertriglyzeridämie häufig mit dem Bild einer schweren Cholestase einhergeht. Nach heutigen Anschauungen muß man dabei von einer Hyperlipoproteinämie sprechen. Das Nüchternplasma dieser Patienten enthält keine Chylomikronen, die VLDL sind in ihrer Konzentration normal, vermehrt oder vermindert; diese Fluktuationen können aber nicht für die Hypertriglyzeridämie verantwortlich sein. Die Protein-Lipid-Zusammensetzung der VLDL-Fraktion ist normal [60]. Den Haupttriglyzeridanstieg bei Störungen der Leberfunktion findet man in der  $LDL_2$ -Fraktion ( $d = 1,019-1,063$  g/ml). Mit Hilfe der Zonalzentrifugation konnten in dieser Fraktion 3 verschiedene Lipoproteine entdeckt werden [39]: 1. LP-X, 2. normale  $\beta$ -Lipoproteine und 3. triglyzeridreiche Lipoproteine. In der Lipoproteinelektrophorese auf Agarose sieht man nur eine Bande in  $\beta$ -Position [60], obwohl in dieser Fraktion 3 verschiedene Lipoproteine vorhanden sind. Diese lassen sich jedoch in der Agarelektrophorese auftrennen [60]. Das LP-X wandert zur Kathode, die  $\beta$ -Lipoproteine zur Anode, das triglyzeridreiche Low-Density-Lipoprotein wandert nicht. In der Immunelektrophorese reagiert das letztere mit Antiseren gegen Apo-B und Apo-C und kann deswegen in seiner typischen Position bereits im Vollserum dieser Patienten mit Cholestase und Hypertriglyzeridämie erkannt werden. Aufgrund seines Gehaltes an Apo-C wird es nach Entfernung des LP-X durch Cohn-Fraktionierung aus der  $LDL_2$ -Fraktion als einziges Lipoprotein dieser Fraktion an einem Immunoabsorber gegen Apo-C durch Affinitätschromatographie gebunden und kann so isoliert werden [60].

Wegen seiner Mobilität in der Lipoproteinelektrophorese auf Agarosegel wurde es als  $\beta_2$ -Lipoprotein bezeichnet [60]. Seine Protein-Lipid-Zusammensetzung unterscheidet es, trotz gleicher Dichte, ganz wesentlich von normalen LDL. Bei ähnlichem Proteingehalt, der aber qualitativ unterschiedlich ist, transportiert es mehr als die 3fache Menge an Triglyzeriden und nur etwas mehr als  $1/3$  so viel Cholesterin, verestertes und unverestertes zu annähernd gleichen Teilen. Normale LDL enthalten nahezu 5mal mehr Cholesterinester als freies Cholesterin. Der Phosphatidgehalt des  $\beta_2$ -Lipoproteins ist um  $1/3$  geringer als der normaler LDL.

Das  $\beta_2$ -LP muß als LP-B:LP-C-Komplex in der  $LDL_2$ -Fraktion bezeichnet werden, von dem man in dieser Fraktion normalerweise nur Spuren findet

[54]. Es handelt sich hierbei also wahrscheinlich um eine abnorme Vermehrung eines normalerweise in nur geringen Mengen auftretenden Lipoproteins. Dieses könnte sich, entweder aufgrund einer Überproduktion, eines verringerten Abbaus oder einer Kombination von beiden, ansammeln.

Wie früher ausgeführt, besteht kein Zweifel mehr darüber, daß bei der Cholestase die Cholesterinproduktion stark gesteigert ist. Da erhöhte VLDL-Konzentrationen im Plasma in der Nüchternphase immer von einer erhöhten hepatischen Cholesterinsynthese begleitet sind [97], wäre es denkbar, daß ein gewisser Anteil einer möglichen vermehrten VLDL-Synthese zur Anreicherung des  $\beta_2$ -LP im Serum dieser Patienten beitragen könnte.

Eigene Diätstudien bei Patienten  $\beta_2$ -LP-bedingter Hypertriglyzeridämie weisen allerdings auf einen gestörten Lipoproteinkatabolismus als wichtige Ursache am Zustandekommen dieser Plasmatriglyzeriderhöhung hin.

Während bei Gesunden eine kohlenhydratreiche und fettarme Kost die VLDL-Synthese steigert und damit den Triglyzeridspiegel im Plasma anhebt, führte bei unseren Patienten diese Kost zu einem Absinken der Plasmatriglyzeridkonzentration. Nach 5 Tagen ist unter solchen Diätbedingungen der Triglyzeridspiegel um durchschnittlich 30% gesunken. Das Verhältnis der Triglyzeride in der VLDL-Fraktion zu denen im VLDL-freien Serum – ein gutes Maß für die Konzentration des  $\beta_2$ -Lipoproteins, normal bei 2 – liegt bei diesen Patienten um 0,35. Nach 5 Tagen oben erwähnter Diät nahm es bis auf 1,0 zu, um dann bei regulärer Kost gleichzeitig mit einem erneuten Anstieg der Plasmatriglyzeride wieder abzusinken. Demnach reguliert sich die Konzentration des  $\beta_2$ -Lipoproteins bei der Cholestase unter anderem durch die Fettzufuhr in der Nahrung. Voraussetzung ist allerdings, daß trotz Gallensalzmangels noch genügend Chylomikronen gebildet werden können. Als hauptsächliche Ursache der  $\beta_2$ -LP-bedingten Hypertriglyzeridämie wird daher nach einem Defekt im Chylomikronenabbau zu suchen sein. Bevor jedoch dieser Aspekt besprochen wird, sei zunächst noch kurz auf den Abbau der VLDL eingegangen, so wie er sich nach dem heutigen Stand der Kenntnisse darstellt [17].

Durch die Einwirkung lipolytischer Enzyme werden die VLDL binnen kurzer Zeit zu einem Intermediärprodukt abgebaut, dessen weiterer Katabolismus wesentlich längere Zeit in Anspruch nimmt. Auf welche Art und Weise aus dem intermediären Lipoprotein LDL werden, ist noch nicht genau bekannt. Wahrscheinlich spielt hierbei eine von der Leber gebildete, im Lebergefäßbett aktive Triglyzeridlipase, die keine Kofaktoren wie C-I oder C-II zu ihrer Aktivität benötigt, eine Rolle. Diese Lipase ist im Postheparinplasma nachweisbar und ist durch hohe Kochsalzkonzentrationen oder Protaminsul-

fat weit weniger hemmbar als die C-II aktivierbare Lipoproteinlipase [43]. Diese Eigenschaft des Enzyms hat zu dem Namen Protamine-insensitive Lipase geführt.

Das im VLDL-Katabolismus gebildete intermediäre Lipoprotein entspricht in seiner Dichte den Lipoproteinen der LDL<sub>1</sub>-Fraktion ( $d = 1,006$  bis  $1,019$  g/ml). Seine Protein-Lipid-Zusammensetzung ist der des  $\beta_2$ -Lipoproteins recht ähnlich. Bei gleichem Phospholipid- und Triglyzeridgehalt bestehen die Hauptunterschiede in einem doppelt so hohen Proteingehalt des  $\beta_2$ -LP, hauptsächlich auf Kosten der Cholesterinester, wodurch es eine höhere Dichte erhält.

Es spricht nun nichts dagegen, daß im Chylomikronenabbau ähnliche intermediäre Lipoproteine entstehen, Lipoproteine, die eine Verwandtschaft oder Identität mit dem  $\beta_2$ -LP zeigen könnten. Die heute gültigen Vorstellungen über den Chylomikronenabbau sind hauptsächlich durch Untersuchungen an der Ratte gewonnen worden [17].

Hier hat man einen Zweistufenabbau festgestellt. In einem ersten Schritt verlieren die Chylomikronen durch enzymatische Hydrolyse vermittelt Apo-C-aktivierter Lipoproteinlipasen, zusammen mit Phospholipiden, Cholesterinestern und Apo-C, einen großen Teil ihrer Triglyzeride. Dieser Vorgang findet vermutlich sowohl am Kapillarendothel als auch in der Zirkulation selbst statt. Die daraus resultierenden cholesterin- und proteinreichen Abbauprodukte werden bei der Ratte zum größten Teil und schnell in die Leber aufgenommen, nachdem ihre Cholesterinester an der Oberfläche der Leberzelle hydrolysiert worden sind. Für die hierfür notwendige Bindung und Aufnahme sind wahrscheinlich spezifische Rezeptoren verantwortlich [17].

Daß der Chylomikronenabbau auch beim Menschen so verläuft, ist zweifelhaft, eher unwahrscheinlich. Die Verweildauer des Zwischenproduktes im Plasma ist länger, und es wird, wahrscheinlich ähnlich wie das intermediäre Lipoprotein des VLDL-Abbaus, durch Einwirkung von Lipasen im Plasma zu LDL degradiert und gelangt nicht, oder nur zu einem geringen Teil, direkt zur Leber.

Der oben erwähnte Diätversuch an unseren Patienten spricht dafür, daß das  $\beta_2$ -LP als ein Abbauprodukt des Chylomikronenstoffwechsels betrachtet werden könnte. Nach unseren Untersuchungen ist die postheparinlipolytische Aktivität (PHLA) von Patienten mit  $\beta_2$ -Lipoprotein-bedingter Hypertriglyzeridämie fast vollständig durch Protamin hemmbar, was ein Hinweis dafür ist, daß die von der Leber gebildete Lipoproteinlipase stark vermindert ist.

Die physiologische Funktion dieses Enzyms ist noch nicht weiter geklärt. In der Postprandialphase ist es im Gegensatz zu den Apo-C-aktivierten Lipasen nicht vermehrt im Plasma nachzuweisen [109]. Dies macht deutlich, daß es seine Funktion

unter physiologischen Umständen hauptsächlich an der Zelloberfläche ausübt. Nach Assmann u. Mitarb. [5] ist es in der äußeren Hepatozytenmembran lokalisiert. Der Umstand, daß zur Entwicklung seiner Funktionen es nicht durch C-Peptide aktiviert werden muß, macht es besonders geeignet, den Abbau triglyzeridreicher Apo-C-armer Lipoproteine zu katalysieren. Es wäre demnach denkbar, daß bei der  $\beta_2$ -LP-bedingten Hypertriglyzeridämie ein intermediäres Lipoprotein von spezifischen Rezeptoren als solches erkannt und an die Leberzelle gebunden wird, und dort einen Großteil seiner Cholesterinester nach Hydrolyse derselben abgibt, sich aber dann wegen eines Mangels an dieser Lipase seiner Triglyzeride nicht entledigen kann, dadurch nur schwer zu normalen LDL abgebaut wird und sich im Plasma anhäuft.

Es ist bekannt, daß C-Peptide leicht zwischen Chylomikronen oder VLDL und HDL ausgetauscht werden können. Aus unseren weiter oben beschriebenen Untersuchungen geht hervor, daß bei der Bildung des LP-X C-Peptide aus dem Plasma gebunden und im LP-X-Partikel akkumuliert werden. Da das  $\beta_2$ -LP in erhöhter Konzentration fast ausschließlich im Plasma von Patienten mit Cholestase auftritt, wäre es denkbar, daß es sich dabei um ein Abbauprodukt Apo-C-armer und deshalb abnorm metabolisierter VLDL oder Chylomikronen handelt, die dann von der ohnehin verminderten hepatischen Triglyzeridlipase nicht zu LDL transformiert werden könnten. Für diese Theorie spricht, daß die  $\beta_2$ -LP-bedingte Hypertriglyzeridämie schon bei Patienten mit Cholestase auftreten kann, die noch keine nennenswerte Einschränkung ihrer Leberfunktion haben. Allerdings können auch die bei Cholestase vermehrt im Plasma vorkommenden Gallensalze zu Lipoproteinveränderungen führen, die einen Abbau sowohl durch die hepatische als auch durch die nichthepatischen Lipoproteinlipasen erschweren.

Abschließend läßt sich wohl sagen, daß die Hypertriglyzeridämie bei Cholestase ihren Ausdruck in der Anhäufung eines triglyzeridreichen, cholesterinesterarmen Low-Density-Lipoproteins findet, wahrscheinlich bedingt durch verminderten Abbau eines intermediären Lipoproteins.

Die LDL-Fraktion dieser Patienten ist ein gutes Beispiel dafür, wie heterogen Lipoproteinfraktionen sein können, obgleich sie einige physikalische Eigenschaften wie Dichte und Ladung gemeinsam haben.

## D Lipoproteinveränderungen der VLDL und HDL-Fraktion bei Leberstörungen

Neben den beschriebenen Veränderungen der LDL-Fraktion findet man bei Lebererkrankungen auch Veränderungen in den anderen Lipoproteinfraktionen [90].

In der analytischen Ultrazentrifuge fand man eine Verminderung der HDL-Fraktion [31], in der Lipoproteinelektrophorese entdeckt man bei Lebererkrankungen manchmal nur eine breite Bande in  $\beta$ -Position, die prä- $\beta$ - und  $\alpha$ -Banden fehlen [90] (vgl. auch Abb. 5). Obgleich dieses Phänomen vornehmlich bei Lebererkrankungen auftritt, kann man es nicht einer spezifischen Leberdysfunktion zuschreiben, es hat also keine sichere differentialdiagnostische Bedeutung.

Die Abwesenheit der Lipoproteinbanden in der Elektrophorese bedeutet nicht notwendigerweise, daß die entsprechenden Lipoproteine im Plasma nicht vorhanden sind.

In der Ultrazentrifuge kann man sehr wohl bei einer Dichte von  $d = 1,006$  g/ml Very-Low-Density-Lipoproteine isolieren, sie können sogar in erhöhter Konzentration vorliegen. Die isolierten VLDL zeigen dann in der Lipoproteinelektrophorese nicht Prä- $\beta$ - sondern  $\beta$ -Mobilität. Daher kann z. B. bei Cholestase die einzige Lipoproteinbande, die  $\beta$ -Lipoproteinbande, aus 4 verschiedenen Lipoproteinen bestehen. Die Ursachen für die veränderte elektrophoretische Mobilität der Lipoproteinfraktionen sind wohl bei den verschiedenen Lebererkrankungen nicht einheitlich.

Inkubiert man normale VLDL mit dem künstlich aus Albumin und Galle hergestellten Lipoprotein, nimmt dieses C-Peptide auf und wird zu LP-X. Die VLDL verarmen an Apo-C und entwickeln  $\beta$ -Mobilität. Man kann wohl annehmen, daß dies bei der Cholestase eine Teilursache für die veränderte Mobilität der VLDL ist [108].

Der nicht vorhandenen  $\alpha$ -Lipoproteinbande entspricht eine generelle Verminderung der HDL um durchschnittlich 75 %. Die Konzentration von A-I und A-II zusammen wird im Plasma jedoch nicht stark erniedrigt gefunden, so daß man annehmen muß, daß sie sich in einem Dichtebereich, der größer als die Dichte der HDL-Fraktion ist, befinden. In der Immunelektrophorese gegen Anti- $\alpha$ -Lipoproteinserum sieht man in der entsprechenden Position starke Präzipitationsbanden, aus deren Form man auf das Vorliegen von mindestens 2 nicht identischen Proteinmolekülen schließen kann [90] (Abb. 5).

Die normale HDL-Fraktion zeigt in der Doppeldiffusion gegen Anti-A-I, Anti-A-II, Anti-D und Anti-C, daß im HDL neben anderen folgende Lipoproteinkomplexe vorliegen [55]: LP-A (bestehend aus A-I und A-II mit allen Lipiden), LP-A : LP-D und LP-A-I mit nur A-I als Apoprotein, ferner noch LP-C in freier Form und assoziiert mit LP-A. Weiterhin gibt es Hinweise für das Vorliegen eines freien LP-D.

Bei Lebererkrankungen enthält die HDL-Fraktion kaum Cholesterin und Triglyzeride, wohl aber Phospholipide. In der Doppeldiffusion hat man

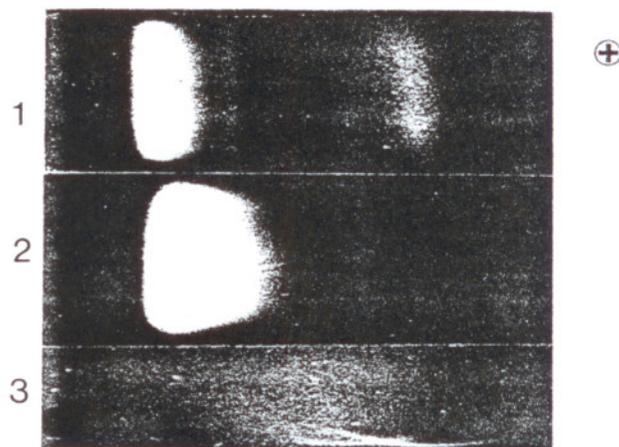


Abb. 5 Agaroselektrophorese von Vollserum

1 = Serum einer gesunden Kontrollperson. Die Lipoproteinbanden wurden durch Polyanionenpräzipitation sichtbar gemacht.

2 = Serum eines Patienten mit akuter cholestatischer Hepatitis. Die Lipoproteinbanden wurden durch Polyanionenpräzipitation sichtbar gemacht.

3 = Immunelektrophorese des Serums des Leberpatienten gegen Anti-Apolipoprotein A. Man sieht deutlich die gespaltenen Immunpräzipitationslinien, obgleich sich in der Lipoproteinelektrophorese keine  $\alpha$ -Lipoproteine darstellen lassen.

sehr deutliche Hinweise für das Vorliegen eines LP-A-II, das den Hauptproteinanteil auszumachen scheint und deshalb wahrscheinlich die Hauptlipide dieser Lipoproteinfraktion transportiert. Weiterhin kann man kein LP-C entdecken, weder in assoziierter noch in freier Form. Die anderen in der HDL beschriebenen Lipoproteinkomplexe kommen in ganz geringen Konzentrationen vor, enthalten aber alle, wie auch das LP-A-II, kaum Cholesterin oder Triglyzeride.

Die normale Verteilung der Apoproteine der HDL-Fraktion kann bei Lebererkrankungen folgendermaßen gestört sein: Es kommt zu einer Dissoziation von A-I und A-II, die einzelnen Apo-Proteine können keine neutralen Fette binden und sind deswegen nicht in ihrer gewöhnlichen Dichteklasse zu finden. Ihre Menge im Plasma mag vermindert sein, aber sicher nicht so stark, wie es die Verringerung der HDL-Fraktion oder  $\alpha$ -Lipoproteinbande vermuten lassen würde.

Weil A-I und A-II aus einem bisher nicht geklärten Grunde keine Neutralfette, wohl aber Phospholipide binden können, lassen sie sich in der Lipoproteinelektrophorese nicht als  $\alpha$ -Lipoproteine darstellen. Ob das Vorhandensein von Neutralfetten eine Vorbedingung für die Existenz von LP-C in der HDL-Fraktion ist, ist nicht bekannt. Ein anderer Zustand, bei dem das Auftreten eines LP-A-II und ein Mangel an LP-C in der HDL-Fraktion beobachtet wird, ist die sog. Tangierkrankheit, eine familiäre LP-A-Mangelkrankheit. Hierbei kommt es

zu Lipoproteinspeicherungen im retikuloendothelialen System. Man nimmt an, daß das Fehlen der High-Density-Lipoproteine als Reservoir für das beim Chylomikronen- und VLDL-Katabolismus anfallende Apo-C zu abnormen Lipoproteinen führt, die dann gespeichert werden. Bei dieser Krankheit findet man einen echten Mangel an A-I und A-II und eine Reihe wahrscheinlich hieraus resultierender Lipoproteinveränderungen [6].

Rekombinationsstudien haben ergeben, daß A-II eine wesentlich höhere Affinität zu Phospholipiden hat als A-I. Die Bindung von Phospholipiden wird als Vorbedingung für die Formation eines Lipoproteins angesehen. Wo man sich den Defekt der HDL bei Lebererkrankungen vorzustellen hat, kann man vielleicht aus einem Modell des HDL-Moleküls entnehmen. Recht klare Vorstellungen hat man von der Struktur des Schweine-HDL.

Hier sind als hauptsächliche Apoproteine nur A-I und C-II vorhanden [40]. A-I liegt zu einem großen Prozentsatz als  $\alpha$ -Helix vor. Die Protein-Lipid-Interaktion findet an den ersten 2 CH-Gruppen der Fettsäuren am Lecithin, die der Glyzerophosphorylcholingruppe benachbart sind, statt. Die Lipidbindung ist unspezifisch. Alle polaren Endgruppen der Phospholipide liegen an der Oberfläche, die Proteine sind relativ starr, die Phospholipide gut beweglich. Die Proteinmoleküle sind alle unregelmäßig in dem Phospholipidmantel verteilt, im Inneren des Moleküls befinden sich die wenig polaren Triglyzeride und Cholesterinester [33].

Beim menschlichen HDL soll A-II die Rolle des Apoproteins einnehmen. A-I wäre an A-II durch Protein-Interaktionen gebunden [7]. Ein LP-A-I müßte allerdings auf jeden Fall anders strukturiert sein. Demnach würde bei Lebererkrankungen der Hauptdefekt im A-II zu suchen sein, das nicht fähig wäre, zusammen mit Phospholipiden die Triglyzeride und das Cholesterin quasi einzupacken und auf der anderen Seite nicht mit A-I reagieren könnte. Dieses könnte u. U. auch eine ungünstige Struktur aufweisen, die eine Bindung zum Komplex mit A-II erschwerte. Es wäre sogar denkbar, daß der primäre Defekt überhaupt im A-I zu suchen ist, woraus sich die beschriebenen Normabweichungen der HDL ebenfalls ableiten ließen. Experimentelle Beweise hierfür stehen ebenso wie eine exakte Quantifizierung der Apoproteine, sowohl im Plasma als auch in der HDL-Fraktion von Patienten mit Lebererkrankungen, noch aus.

Bei Cholestase könnte u. U. eine Verarmung der HDL an Apo-D und Apo-C, die beide vom LP-X gebunden werden, zu diesen Veränderungen führen. Das würde aber bedeuten, daß LP-C ein integraler Bestandteil der HDL-Fraktion oder sogar des Partikels ist. Dies trifft sicher nicht für alle anderen Lipoproteine zu, an deren Aufbau Apo-C beteiligt ist. Während der Postprandialphase verlieren die HDL Apo-C an die Chylomikronen, ohne daß da-

bei die  $\alpha$ -Lipoproteine verschwinden. Zudem bestehen über 60% der High-Density-Lipoproteine aus LP-A, sind also frei von LP-C [52]. Daher haben wohl die HDL-Veränderungen bei Cholestase eine andere Ursache als einen Mangel an Apo-C.

Die Veränderungen der VLDL-Mobilität bei nicht cholestatischen Lebererkrankungen sind ebenfalls noch schwer zu verstehen. Eine mögliche Erklärung, die von uns früher vorgeschlagen wurde, wäre eine ähnliche Strukturveränderung oder gänzlich Fehlen des Apo-A im VLDL, welches immer in mehr oder weniger geringen Spuren in dieser Fraktion entdeckt werden kann. Inkubation mit normalen HDL führt zu Wiederherstellung der Prä- $\beta$ -Mobilität dieser VLDL-Fraktion. Dies könnte allerdings auch durch einen Zufluß von LP-C bewirkt werden.

Es ist noch nicht bekannt, wo Apo-C gebildet wird. Die naszierenden Chylomikronen bekommen es aus der Zirkulation. Naszierende VLDL enthalten vermutlich sehr wenig bis gar kein Apo-C [111]. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß Apo-C in der Leber gebildet wird. Daher kann eine starke Störung der Leberfunktion u. U. zu einem Mangel an Apo-C führen und somit zu einem VLDL mit veränderter Mobilität aber normaler Größe, wie aus der Polyacrylamidelektrophorese und elektronenmikroskopischen Messungen hervorgeht [90].

Wie bei Tangier-Disease kann ein Mangel an einem Reservoir für LP-C zu einem gestörten Abbau der Chylomikronen und VLDL führen, der in Verbindung mit einer Verminderung der hepatischen Triglyzeridlipasen ebenfalls zum Vorkommen des  $\beta_2$ -LP führen könnte.

LP-X,  $\beta_2$ -LP und VLDL mit  $\beta$ -Mobilität hat man neben HDL-Veränderungen auch bei Patienten mit LCAT-Deficiency gefunden [53, 101]. Diese Patienten haben, wie auch Patienten mit Leberstörungen, erniedrigte Konzentrationen von Apo-B und Apo-A-I in ihrem Plasma [53]. Ebenso wurde die HDL-Fraktion vermindert gefunden, jedoch konnten hier LP-A-I und LP-C nachgewiesen werden [53], Lipoproteine, die auch im Normalplasma vorkommen. Diese Lipoproteine sind aber nicht verantwortlich für die beobachteten Rouleaux-Formationen in der HDL-Fraktion von Patienten mit LCAT-Deficiency. Uterman u. Mitarb. [102] konnten in der HDL<sub>2</sub>-Fraktion von Patienten mit Cholestase und sekundärer LCAT-Deficiency neben den üblichen Apoproteinen eine hohe Konzentration von Apo-E (arginine-rich Peptide) feststellen. Das Lipoprotein, das dieses Apoprotein enthält, wandert in Prä- $\beta$ -Position. Danielson u. Mitarb. haben es wahrscheinlich mit der Zonalzentrifuge isoliert [15]. Zusätzlich zu Apo-E enthält es geringe Mengen von A-I und Apo-C.

Zusammen mit anderen Mechanismen könnte auch ein sekundärer Mangel an LCAT zu den Lipoproteinveränderungen bei Lebererkrankungen bei-

tragen, ist aber wohl in den allerseltensten Fällen die alleinige Ursache für das Auftreten der vielen abnormen Lipoproteine.

Die einzige krankheitsspezifische Lipoproteinveränderung bei Lebererkrankungen ist wohl das Auftreten des LP-X. Die anderen abnormen Lipoproteine sind wahrscheinlich den verschiedensten Ursachen zuzuordnen.

Es erscheint durchaus möglich, daß man durch verfeinerte Methoden, wie quantitative Immunoelktrophorese, quantitative Polyacrylamidelektrophorese oder Radioimmunoassay, für alle Apoproteine Veränderungen des Lipoproteinsystems noch besser charakterisieren kann, mit der Möglichkeit, daraus dann differentialdiagnostische Schlüsse zu ziehen. Die Lipoproteine stellen offensichtlich einen sehr empfindlichen Marker für Leberstörungen der verschiedensten Genese dar.

## Literatur

1. *Ahrens, E. H., H. C. Kunkel*: The relationship between serum lipids and skin xanthomata in 18 patients with primary biliary cirrhosis. *J. clin. Invest.* 28, 1565 (1949).
2. *Ahrens, E. H., H. G. Kunkel*: The stabilization of serum lipid emulsions by serum phospholipids. *J. exp. Med.* 90, 409 (1949).
3. *Alaupović, P., D. M. Lee, W. J. McConathy*: Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins; Distribution of lipoprotein families in major density-classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim. biophys. Acta* 260, 689 (1972).
4. *Alcindor, L. G., R. Infante, J. Caroli*: Plasma VLDL catabolism in cholestasis. Abstr. 5th meeting of the int. Ass. for the study of the liver. Versailles July 1972.
5. *Assmann, G., R. M. Krauss, D. S. Fredrickson, R. J. Levy*: Characterization, subcellular localization and partial purification of a heparin released triglyceride lipase from rat liver. *J. biol. Chem.* 248, 1922 (1973).
6. *Assmann, G., D. S. Fredrickson, P. Herbert, T. Forte, R. Heinen*: An A-II lipoprotein particle in tangier disease. *Circulation (Suppl. 3)* 49, 259 (1974).
7. *Assmann, G., B. Breuer*: Lipid-protein-interactions in high-density-lipoproteins. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 71, 989 (1974).
8. *Baker, H. N., R. L. Jackson, A. M. Gotto jr.*: Isolation and characterization of the cyanogen bromide fragments from the high-density apolipoprotein glutamine-I. *Biochemistry* 12, 3866 (1973).
9. *Baraona, E., L. S. Lieber*: Effects of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the rat. *J. clin. Invest.* 49, 769 (1970).
10. *Bhattachary, E., M. Siperstein*: Feedback control of cholesterol synthesis in man. *J. clin. Invest.* 42, 1613 (1963).
11. *Brocklehurst, D., G. H. Lahte, S. R. Aparicio*: Serum alkaline phosphatase, nucleotide pyrophosphatase, 5'-nucleotidase and lipoprotein-X in cholestasis. *Clin. chim. Acta* 67, 269 (1976).
12. *Byers, S. O., M. Friedman*: Observations concerning the production and excretion of cholesterol in mammals. *J. exp. Med.* 95, 19 (1952).
13. *Camejo, G., V. Bosch, C. Arreaza, J. H. Mendez*: Early changes in plasma lipoprotein structure and biosynthesis in cholesterol-fed rabbits. *J. Lipid Res.* 61, 4 (1973).
14. *Cooper, A. D., K. Ockner*: Studies of hepatic cholesterol synthesis in experimental acute biliary obstruction. *Gastroenterology* 66, 586 (1974).
15. *Danielson, B., R. Ekman, B.-G. Peterson*: An abnormal high-density-lipoprotein in cholestatic plasma isolated by zonal ultracentrifugation. *Febs Letters* 50, 180 (1975).
16. *Danielson, B., R. Ekman, B. G. Johansson, B. G. Petersson*: Zonal ultracentrifugation of plasma lipoproteins from normal and cholestatic pigs. *Clin. chim. Acta* 65, 187 (1975).
17. *Eisenberg, S., R. J. Levy*: Lipoprotein Metabolism. In: *Advances in lipid research*. Academic Press, New York 1975.
18. *Epstein, E. Z.*: Cholesterol of the blood plasma in hepatic and biliary diseases. *Arch. intern. Med.* 50, 203 (1932).
19. *Fellin, R., D. Seidel*: Behaviour of serum lipoproteins in cholestasis. I. *Int. Symp. on cholestasis*, Florence June 1973.
20. *Feigl, J.*: Neue Untersuchungen über akute gelbe Leberatrophie. III. Fette und Lipide des Blutes. Chemische Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung und Charakteristik spezifischer Lipämien. *Biochem. Z.* 86, 1 (1918).
21. *Fielding, C. J.*: A protein cofactor of lecithin: Cholesterol acyltransferase. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 46, 1493 (1972).
22. *Fischer, M., Ch. Falkensommer, G. Barouch, St. Wuketich, O. Kronberger, H. Schnach*: Zur Diagnostik der Cholestase: Lipoprotein-X (LP-X). *Wien. klin. Wschr.* 87, 524 (1975).
23. *Flint, A. jr.*: Experimental researches into a new excretory function of the liver, consisting in the removal of cholesterol from the blood, and its discharge from the body in the form of stercoirine. *Amer. J. med. Sci.* 44, 305 (1862).
24. *Fredrickson, D. S., R. I. Levy, R. S. Lees*: Fat transport in lipoproteins - An integrated approach to mechanisms and disorders. *New Engl. J. Med.* 276, 273 (1967).
25. *Friedman, M. S., O. Byers, R. H. Roseman*: Lipogenic hypercholesterolemia. A guide for reorientation in the consideration of lipid-cholesterol relationships. *Arch. intern. Med.* 116, 807 (1965).
26. *Furman, R. H., L. L. Conrad, R. P. Howard*: A serum lipoprotein pattern characteristic of biliary obstruction, with some comments on „jaundice due to methyltestosterone“. *Circulation* 10, 586 (1954).
27. *Furman, R. H., L. L. Conrad*: Ultracentrifugal characterization of the lipoprotein spectrum in obstructive jaundice: Studies of serum lipid relationships in intra- and extrahepatic biliary obstruction. *J. clin. Invest.* 36, 713 (1957).
28. *Ganesan, D., R. H. Bradford, P. Alaupovic, W. J. McConathy*: Differential activation of lipoprotein lipase from human post-heparin plasma, milk and adipose tissue by polypeptides of human serum apolipoprotein C. *Febs Letters* 15, 205 (1971).
29. *Glomset, J. A., K. A. Norum*: The metabolic role of lecithin: Cholesterol acyltransferase: Perspectives from pathology. *Advanc. Lipid Res.* 11, 1 (1973).
30. *Goldstein, J. L., M. S. Brown*: Binding and degradation of Low-Density-Lipoproteins by cultured human fibroblasts. *J. biol. Chem.* 249, 5153 (1974).
31. *Gofman, J.*: The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary artery diseases. *Plasma Milano* 2, 484 (1954).

32. Hauser, H.: Lipid-Protein interaction in porcine high-density (HDL<sub>3</sub>) lipoprotein. *Febs Letters* 60, 71 (1975).
33. Havel, R. J., J. P. Kane, M. L. Koshap: Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. *J. clin. Invest.* 52, 32 (1973).
34. Havel, R. J., H. A. Eder, J. H. Bragdon: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. clin. Invest.* 34, 1345 (1955).
35. Hoff, H. F., J. D. Morrisett, A. M. Gotto jr.: Interaction of phosphatidylcholine and apoproteinalanine: electron-microscopic studies. *Biochem. biophys. Acta* 265, 471 (1972).
36. Jackson, R. L., A. M. Gotto jr.: A study of the cystine-containing apolipoprotein of human plasma high-density-lipoproteins: Characterization of cyanogen bromide and tryptic fragments. *Biochem. biophys. Acta* 285, 36 (1972).
37. Jensen, J.: The story of xanthomatosis in England prior to the first world war. *Clin. Med.* 2, 289 (1967).
38. Jonas, A., D. Seidel: Properties of the Abnormal Human Plasma Lipoprotein (LP-X) Characteristic of Cholestasis After Chemical Modification with Succinic Anhydride. *Arch. Biochem.* 163, 200 (1974).
39. Klör, U., H. H. Ditschuneit, D. Rakow, H. Ditschuneit: Further characterization of dyslipoproteinemia in hepatic disease. *Abstracts Europ. J. clin. Invest.* 2, 291 (1972).
40. Knipping, G. M. J., G. M. Kostner, A. Holasek: Studies on the Composition of Pig Serum Lipoproteins. Isolation and characterization of different Apoproteins. *Biochem. biophys. Acta* 393, 88 (1975).
41. Kostner, G. M., W. Petek, A. Holasek: Immunochemical measurement of lipoprotein-X. *Clin. Chem.* 20, 676 (1974).
42. Kostner, G. M.: Studies on the cofactor requirements of Lecithin-cholesterol-Acyltransferase. *Scand. J. clin. Invest. (Suppl.)* 33, 19 (1974).
43. Krauss, R. M., H. G. Windmueller, R. I. Levy, D. S. Fredrickson: Selective measurement of two different triglyceride lipase activities in rat post-heparin plasma. *J. Lipid. Res.* 14, 286 (1973).
44. Kunkel, H. G., E. H. Ahrens: The relationship between serum lipids and the electrophoretic pattern, with particular reference to patients with primary biliary cirrhosis. *J. clin. Invest.* 28, 1575 (1949).
45. Kunkel, H. G., R. J. Slater: Lipoprotein patterns of serum obtained by zone electrophoresis. *J. clin. Invest.* 31, 677 (1952).
46. DeLalla, L., L. Levine, R. K. Brown: Immunologic studies of human high density lipoproteins. *J. exp. Med.* 106, 261 (1957).
47. Liersch, M., G. Baggio, C. C. Heuck, D. Seidel: Effect of Lp-x on cholesterol Biosynthesis in Rat Liver. Tenth Annual Meeting. *Europ. Society for Clinical Investigation*, Abstract No 121 (1976).
48. Magnani, H. N., P. Alaupovic: A method for the quantitative determination of the abnormal lipoprotein (LP-X) of obstructive jaundice. *Clin. chim. Acta* 38, 405 (1972).
49. Mahley, R. W., K. H. Weisgraber: An electrophoretic method for the quantitative isolation of human and swine plasma lipoproteins. *Biochemistry* 13, 1964 (1974).
50. Manzato, E., R. Fellin, G. Baggio, W. Neubeck, D. Seidel: Formation of lipoprotein-X: Its relationship to bile compounds. *J. clin. Invest.* 57, 1248 (1976).
51. Mayr, K.: Der Wert des Nachweises von Lipoprotein-X zur Feststellung einer Cholestase: Ein Vergleich mit anderen klinisch-chemischen Untersuchungen. *Dtsch. med. Wschr.* 100, 2193 (1975).
52. McConathy, W. J., H. Wieland, P. Alaupovic: Unveröffentlichte Beobachtungen.
53. McConathy, W. J., P. Alaupovic, M. D. Curry, H. N. Magnani, H. Trosvik, K. Berg, E. Gjone: Identification of lipoprotein families in familial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. *Biochem. biophys. Acta* 326, 406 (1973).
54. McConathy, W. J., H. Wieland, P. Alaupovic: Unpublizierte Beobachtungen.
55. McConathy, W. J., P. Alaupovic: Persönliche Mitteilungen.
56. Mills, G. L., D. Seidel, P. Alaupovic: Ultracentrifugal characterization of a lipoprotein occurring in obstructive jaundice. *Clin. chim. Acta* 26, 239 (1969).
57. Mordasini, R. C., S. Berthold, E. Schlumpf, H. Keller, G. Riva: Lipoprotein-X bei Hepatobiliären Erkrankungen. *Schweiz. med. Wschr.* 105, 863 (1975).
58. Morrisett, J. D.: Persönliche Mitteilung.
59. Müller, P., U. Fauser, R. Fellin, H. Wieland, D. Seidel: Isolation and characterization of lipoprotein-X (LP-X) from canine. *Febs Letters* 38, 53 (1973).
60. Müller, P., R. Fellin, J. Lambrecht, B. Agostini, H. Wieland, W. Rost, D. Seidel: Hypertriglyceridemia secondary to liver disease. *Europ. J. clin. Invest.* 4, 419 (1974).
61. Nalbano, G., H. Lafont, N. Domingo, D. Lairon, G. Pautrat, J. Hauton: Ultramicroscopic study of the bile lipoprotein complex. *Biochimie* 55, 1503 (1973).
62. Neubeck, W., D. Seidel: Direct method for quantitative determination of lipoprotein-X (LP-X). *Clin. chem.* 21, 853 (1975).
63. Neurath, R. A., A. M. Prince, A. Lippin: Hepatitis B antigen: Antigenic sites related to human serum proteins revealed by affinity chromatography. *Proc. nat. Acad. Sci.* 71, 2663 (1974).
64. Ockner, R. K., K. J. Bloch, K. J. Isselbacher: Very-low-density-lipoprotein in intestinal lymph: evidence for presence of the A protein. *Science* 162, 1285 (1968).
65. Patsch, W., J. Patsch, S. Sailer: In vitro degradation of Lp-x by normal Plasma. *Europ. Soc. for Clin. Invest.* 10th Ann. Meeting Abstr. Nr. 242 (1976).
66. Pearson, A. J. G.: Triglycerides in obstructive liver disease. *Abstr. 5th meeting of the int. Ass. for the study of the liver, Versailles July 1972.*
67. Petek, W., G. Kostner, A. Holasek: Untersuchungen zur Methodik der immunologischen Lipoprotein-X (LP-X) Bestimmung. *Z. klin. Chem.* 11, 415 (1973).
68. Phair, R. D., M. G. Hammond, J. A. Bowden, M. Fried, W. R. Fisher, M. Berman: A preliminary model for human lipoprotein metabolism in hyperlipoproteinemia. *Fed. Proc.* 13, 2263 (1975).
69. Picard, J., D. Veissière: Separation des lipoproteines sériques anormales dans la cholestase. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 270, 1845 (1970).
70. Poley, J. R., P. Alaupovic, D. Seidel, W. J. McConathy: Differential diagnosis between neonatal hepatitis and extrahepatic biliary arteria in infants: A new test. *Gastroenterology* 58, 983 (1970).
71. Prexl, H. J., W. Petek: Die Bedeutung des Lipoprotein-X und der Serumcholinesterase in der präoperativen Diagnostik des Verschlussikterus. *Chirurg* 44, 310 (1973).
72. Quarfordt, S. H., H. Oelschlager, W. R. Krigbaum, L. Jakobi, R. Davis: Effect of biliary obstruction on canine plasma and biliary lipids. *Lipids* 8, 522 (1973).
73. Rittland, S., J. P. Blomhoff, K. Elgjo, E. Gjone: Lipoprotein-X (LP-X) in liver disease. *Scand. J. Gastroent.* 8, 155 (1973).

74. Rittland, S.: Quantitative determination of the abnormal lipoprotein of cholestasis, LP-X, in liver disease. *Scand. J. Gastroent.* 10, 5 (1975).
75. Rittland, S., E. Gjone: Quantitative determination of LP-X in familial LCAT deficiency and during cholesterol esterification. *Clin. chim. Acta* 59, 109 (1975).
76. Roheim, P. S., L. I. Gidez, A. Eder: Extrahepatic synthesis of lipoproteins of plasma and chyle: Role of the intestine. *J. clin. Invest.* 45, 297 (1971).
77. Roheim, P. S., D. Rachmilewitz, O. Stein, Y. Stein: Metabolism of iodinated high-density lipoproteins in the rat. I. Half life in the circulation and uptake by organs. *Biochem. biophys. Acta* 268, 315 (1971).
78. Rosti, D., G. C. Gaspari: Valore diagnostico della LP-X negli itteri neonatali. *Minerva pediat.* 1 (1974).
79. Rothschild, M. A., J. Felsen: The cholesterol content of the blood in various hepatic conditions. *Arch. intern. Med.* 24, 520 (1919).
80. Russ, E. M., J. Raymunt, D. P. Barr: Lipoproteins in primary biliary cirrhosis. *J. clin. Invest.* 35, 133 (1956).
81. Sardet, C., H. Hansma, R. Ostwald: Characterization of guinea pig plasma lipoproteins: The appearance of new lipoproteins in response to dietary cholesterol. *J. Lipid. Res.* 13, 624 (1972).
82. Seidel, D., P. Alaupovic, R. H. Furman: A lipoprotein characterizing obstructive jaundice. I. Method for quantitative separation and identification of lipoproteins in jaundiced subjects. *J. clin. Invest.* 48, 1211 (1969).
83. Seidel, D., P. Alaupovic, R. H. Furman, W. J. McConathy: A lipoprotein characterizing obstructive jaundice. II. Isolation and partial characterization of the protein moieties of low density lipoproteins. *J. clin. Invest.* 49, 2396 (1970).
84. Seidel, D., A. Agostini, P. Müller: Structure of an abnormal plasma lipoprotein (LP-X) characterizing obstructive jaundice. *Biochem. biophys. Acta* 260, 146 (1972).
85. Seidel, D.: Structure of Lipoprotein-X. Exposé *Annels de Biochimie Médicale* 1972, Masson et Cie Paris.
86. Seidel, D., E. A. Schmitt, P. Alaupovic: An abnormal low density lipoprotein in obstructive jaundice. II. Significance in differential diagnosis of jaundice. *Dtsch. med. Wschr.* 15, 671 (1970).
87. Seidel, D., H. Wieland: Nicht veröffentlichte Resultate.
88. Seidel, D., G. Baggio: Unveröffentlichte Beobachtungen.
89. Seidel, D., H. K. Büff, U. Fauser, K. Bleyl: On the metabolism of lipoprotein-X (LP-X). *Clin. chim. Acta* 66, 195 (1976).
90. Seidel, D., H. Greten, H. P. Geisen, H. Wengeler, H. Wieland: Further Aspects on the Characterization of High and Very Low Density Lipoproteins in Patients with Liver Disease. *Europ. J. clin. Invest.* 2, 359 (1972a).
91. Seidel, D., G. Baggio: Origin and metabolism of lipoprotein-X. *Europ. Soc. for the study of the liver*, Barcelona 11.-13. Sept. 1975.
92. Seidel, D., H. Wieland, C. Ruppert: Improved Techniques for Assessment of Plasma Lipoprotein Patterns. I. Precipitation in Gels after Electrophoresis with Polyanionic Compounds. *Clin. Chem.* 19, 737 (1973).
93. Seidel, D., E. Gjone, J. P. Blomhoff, H. P. Geisen: Plasma lipoproteins in patients with familial plasma lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency - Studies on the apolipoprotein composition of isolated fractions with identification of LP-X. *Int. Symp. on Lipid Metabolism, Obesity and Diabetes mellitus. Impact upon Atherosclerosis*, Wiesbaden April, 1972b.
94. Shore, V. G., B. Shore: Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins - separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12, 502 (1973).
95. Shulman, R. S., P. N. Herbert, D. S. Fredrickson: Isolation and alignment of the tryptic peptides of alamine apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins. *J. biol. Chem.* 249, 4949 (1974).
96. Shulman, R. S., P. N. Herbert, K. Wehrly, B. Chesebro, R. J. Levy, D. S. Fredrickson: The complete amino-acid sequence of Apo-Lp-Ser: An Apolipoprotein obtained from human very low density lipoprotein. *Circulation (Suppl.)* 46, 246 (1972).
97. Sodhi, H. S., B. J. Kudchodkar: Correlating Metabolism of Plasma and Tissue cholesterol with that of Plasma-Lipoproteins. *Lancet* 10, 513 (1973).
98. Stein, O., M. D. Alkan, Y. Stein: Obstructive jaundice lipoprotein particles studies in ultrathin sections of livers of bile duct ligated mice. *Lab. Invest.* 29, 176 (1974).
99. Switzer, S.: Plasma lipoproteins in liver disease. I. Immunologically distinct low-density lipoproteins in patients with biliary obstruction. *J. clin. Invest.* 46, 1855 (1967).
100. Tannhauser, S. J., H. Schaber: Über die Beziehung des Gleichgewichtes Cholesterin und Cholesterinester im Blut und Serum zur Leberfunktion. *Klin. Wschr.* 5, 252 (1926).
101. Torsvik, H., K. Berg, H. N. Magnani, W. J. McConathy, P. Alaupovic, E. Gjone: Identification of the abnormal cholestatic lipoprotein (LP-X) in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. *Febs Letters* 24, 165 (1973).
102. Uterman, G., H. J. Menzel, K. H. Langer: On the polypeptide composition of an abnormal high-density lipoprotein (Lp-E) occurring in LCAT-deficient plasma. *Febs Letters* 45, 29 (1974).
103. Vergani, C., M. Petrogrande, M. C. Grondana, A. Pizzolato: Studio do una lipoproteina anomala (LP-X) caratteristica della colestasi. *Clin. Med.* 64, 1461 (1973).
104. Weis, H. J., J. M. Dietschy: Presence of an intact cholesterol feedback mechanism in the liver in biliary stasis. *Gastroenterology* 61, 77 (1971).
105. Wengeler, H., H. Greten, D. Seidel: Serum cholesterol esterification in liver disease. Combined determination of lecithin: cholesterol acyltransferase and lipoprotein-X. *Europ. J. clin. Invest.* 1, 372 (1971).
106. Wieland, H., D. Seidel: Eine neue und vereinfachte Methode zum Nachweis des LP-X, eines cholestasespezifischen Lipoproteins. *Dtsch. med. Wschr.* 98, 1474 (1973).
107. Wieland, H., D. Seidel: Unveröffentlichte Beobachtung.
108. Wieland, H., G. Baggio, D. Seidel: Unveröffentlichte Beobachtung.
109. Wieland, H., D. Ganesan, W. J. McConathy, P. Alaupovic: Lipoproteins and lipolytic activities in the postprandial state (in Vorbereitung).
110. Wieland, H., D. Seidel: Unveröffentlichte Beobachtung.
111. Windmueller, H. G., P. H. Herbert, R. J. Levy: Biosyntheses at lymph and plasma lipoprotein apoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. *J. Lipid Res.* 14, 215 (1973).

Für die Verfasser

Dr. H. Wieland  
Klinisch-Chemisches Laboratorium  
der Medizinischen Universitätsklinik  
Bergheimer Straße 58  
6900 Heidelberg