

Ein abnormes Low-density-Lipoprotein bei Cholestase

I. Isolierung und Charakterisierung

D. Seidel und P. Alaupovic*

Medizinische Universitätsklinik Heidelberg (Ludolf-Krehl-Klinik)
(Direktor: Prof. Dr. G. Schettler) und Oklahoma-Medical-
Research-Foundation, Oklahoma-City, USA

Seitdem bekannt ist, daß die wasserunlöslichen Lipide im Plasma transportiert werden, indem sie einen makromolekularen Komplex mit spezifischen Proteinen eingehen, konzentriert sich das Interesse vieler Forschungsgruppen auf die Analyse dieser Lipid-Protein-Komplexe. Man bezeichnet diese Komplexe als Plasmalipoproteine.

Ergebnisse der Lipidforschung der letzten Jahre haben vielfältig gezeigt, daß den Plasmalipoproteinen eine zentrale Stellung bei der Differenzierung und in der Suche nach den pathophysiologischen Zusammenhängen der Hyperlipidämien zukommt. Das gilt gleichermaßen für die primären (oder familiären) wie für die sekundären Hyperlipidämien. Sie alle gehen mit Konzentrationsänderungen und/oder Verschiebungen der Protein-Lipid-Zusammensetzung der Plasmalipoproteine einher und sollten

* Oklahoma-Medical-Research-Foundation, Oklahoma-City, USA.

Tab. 1. Prozentuale Protein-Lipid-Zusammensetzung der Plasmalipoproteine stoffwechselgesunder Personen (nach Bragdon und Mitarbeitern [7]). VLDL = very low density lipoproteins, LDL = low density lipoproteins, HDL = high density lipoproteins

| Dichteklasse | Cholesterin-ester | freies Cholesterin | Phospholipide | Triglyceride | Protein |
|----------------------------|-------------------|--------------------|---------------|--------------|---------|
| VLDL ($d < 1,006$) | 16,2 | 6,0 | 17,9 | 51,8 | 7,1 |
| LDL ($d 1,006-1,063$) | 39,4 | 7,5 | 23,1 | 9,3 | 20,7 |
| HDL ($d 1,063-1,21$) | 18,5 | 2,3 | 26,9 | 4,6 | 47,7 |

daher auch als Hyperlipoproteinämien bezeichnet werden (20).

In der Leber wird der überwiegende Teil der Plasmalipoproteine synthetisiert, ab- und umgebaut (10, 11, 19, 21, 26, 37, 40, 41, 56, 57). Daher ist die Annahme verständlich, daß Leberstörungen zu quantitativen und unter Umständen auch zu qualitativen Veränderungen des sogenannten Plasmalipoproteinmusters führen können.

Klassifizierung und Nomenklatur der Plasmalipoide

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Plasmalipoproteine sind bestimmt durch die Protein-Lipid-Zusammensetzung, wobei ihre Dichte (»density«) vorwiegend vom Gehalt an Neutralfetten (Triglyceride und Cholesterinester) abhängt (Tabelle 1). Die Dichte und die elektrophoretische Mobilität der Plasmalipoproteine sind die Grundlage zweier üblicher Einteilungssysteme (Tabelle 2). Unter Verwendung der Ultrazentrifuge lassen sich die Plasmalipoproteine in drei Gruppen fraktionieren:

1. VLDL (very low density lipoproteins, die Chylomikronen eingeschlossen), $d < 1,006$ g/ml, $S_f > 20$,
2. LDL (low density lipoproteins), $d 1,006-1,063$ g/ml, $S_f = 0-20$,
3. HDL (high density lipoproteins), $d 1,063-1,210$ g/ml.

Die elektrophoretische Trennung der Plasmalipoproteine erlaubt eine Aufteilung in mindestens vier Fraktionen:

1. die nicht wandernden Chylomikronen,

Tab. 2. Klassifizierung der Plasmalipoproteine. LP = Lipoprotein, VLDL = very low density lipoproteins, LDL = low density lipoproteins, HDL = high density lipoproteins

| Elektrophorese | | Dichteklassen | | Apolipoproteine |
|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| + | Albumin | d | >1,21 | Albumin |
| | α -LP | d | 1,063–1,21 | HDL |
| | Prä- β -LP | S _f d | 20–400 < 1,006 | VLDL |
| | β -LP | S _f d | 0–20 1,006–1,063 | LDL |
| Auftrag- stelle | Chylo- mikronen | S _f d | > 400 < 1,006 | VLDL |
| — | | | | |

2. die mit den β -Globulinen wandernden β -Lipoproteine,
3. die Prä- β -Lipoproteine und
4. die α -Lipoproteine mit einer Mobilität der α_1 -Globuline.

Sowohl die polydispersen Dichteklassen als auch die elektrophoretisch trennbaren Fraktionen stellen heterogene Gruppen hinsichtlich ihrer Proteinanteile, der sogenannten Apolipoproteine, dar (Tabelle 2). Mit chemischen und immunologischen Untersuchungsmethoden ließ sich zeigen, daß mindestens drei von einander verschiedene Apolipoproteine (Apo A, Apo B und Apo C) im Plasma des Menschen vorkommen. Hieraus ergibt sich die dritte Klassifizierungsmöglichkeit der Plasmalipoproteine: eine Einordnung in Familien mit gleichen Apolipoproteinen. Zu unterscheiden sind (Tabelle 2):

1. LP-A (Lipoprotein-A) mit Apo A als Proteinanteil,
2. LP-B (Lipoprotein-B) mit Apo B als Proteinanteil,
3. LP-C (Lipoprotein-C) mit Apo C als Apolipoprotein.

Neueste Untersuchungen von Shore und Shore (52–54) haben ältere Befunde gesichert, wonach Apo A aus zwei nicht identischen Peptiden besteht. Ebenso gibt es Hinweise dafür, daß Apo B (33, 34) und auch Apo C (8, 9, 27, 38) aus nicht identischen Peptiden bestehen.

Da auch vom Albumin bekannt ist, daß es freie Fettsäuren und Phospholipide, besonders Lysolecithin, zu binden vermag, besteht

kein zwingender Grund, es nicht ebenfalls als Plasmalipoprotein zu bezeichnen.

Das Plasmalipoproteinmuster bei Patienten mit Cholestase

Mit der Entwicklung von Techniken, die geeignet waren, die Plasmalipoproteine in verschiedene Fraktionen zu unterteilen und zu charakterisieren, begann auch das Bemühen, die Vorgänge, die zu einer Störung des Plasmalipid- und Plasmalipoprotein-Musters beim Verschlußikterus führen, genauer zu analysieren.

Kunkel und Mitarbeiter (30, 31) fanden bei Verwendung der Zonen-Elektrophorese eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Gesamtlipide und der Konzentration der β -Globuline. Die gleiche Gruppe vermutete als erste, daß speziell die Phospholipidsteigerung im Plasma die Ursache für die Hyperlipoproteinämie bei der Cholestase sein könnte. Es wird angenommen, daß die Phospholipide die Stabilität der Plasmalipoproteinkomplexe erhöhen (1, 2, 22, 29) und damit die Bindungskapazität für Cholesterin steigern. Gofman und Mitarbeiter (25, 39, 46) beschrieben als erste einen charakteristischen Konzentrationsanstieg der Low-density-Lipoproteine (S_f 0 bis 10 und 10–20; d 1,006–1,063 g/ml) und mehrere andere Gruppen (23, 24, 28, 36) zusätzlich einen Konzentrationsabfall der High-density-Lipoproteine (d 1,063–1,21 g/ml) im Plasma von Patienten mit Verschlußikterus.

Eder, Russ, Barr und Mitarbeiter (6, 17, 18) fanden hingegen, daß der charakteristische Anstieg an freiem Cholesterin und Phospholipiden bedingt ist durch ein Lipoprotein mit abnormer Protein-Lipid-Zusammensetzung in der Cohn-Fraktion IV–VI (16), in der normalerweise die High-density-Lipoproteine oder α -Lipoproteine enthalten sind. Russ und Mitarbeiter (47) konnten diesen scheinbaren Widerspruch wenigstens teilweise beheben, indem sie zeigten, daß die in der Cohn-Fraktion IV–VI enthaltenen Lipoproteine bei Cholestase zum Teil eine Dichte von d 1,035–1,049 g/ml besitzen, aber nicht mit Antiserum immunologisch reagieren, das gegen β -Lipoproteine gerichtet ist. Ebenso beschrieb Switzer (58) bei Patienten mit Verschlußikterus in der LDL-Fraktion ein Lipoprotein, welches nicht mit anti- β -Lipoproteinserum reagierte und sich durch einen (für ein Low-density-Lipoprotein) ungewöhnlich niedrigen Protein- und hohen Phospholipid- sowie freien Cholesterin-Anteil auszeichnete. Wegen der Tatsache, daß die High-density-Lipoproteine oder α -Lipoproteine den prozentual höchsten Phospholipidgehalt aufweisen, und durch den immunologischen Nachweis von LP-A (als Hauptbestandteil der High-density-Lipoproteine) (20, 32, 35, 55) in der LDL-Fraktion von Patienten mit Verschlußikterus wurde vermutet, daß es zu dem Konzentrationsanstieg der LDL-Fraktion durch eine

Verschiebung des LP-A aus der HDL- in die LDL-Fraktion kommen könnte. Ähnlich berichteten kürzlich Burstein und Caroli (13, 14) über ein β -Lipoprotein im Plasma von Patienten mit Verschlußikterus, das nach totaler Delipidierung in der Papierelektrophorese eine α_1 -Globulin-Mobilität zeigte. Da das Apo B unter normalen Bedingungen unlöslich ist, nicht aber das Apo A, kamen die Autoren auch zu dem Schluß, daß es sich bei dem abnormen low density lipoprotein um eine besondere Form eines α -Lipoproteins handeln muß.

Obwohl diese Vorstellung, wie wir später zeigen werden, durch unsere Untersuchungen widerlegt werden konnte, ist sie theoretisch denkbar, wenn man annimmt, daß ein LP-A aus der High-density-Lipoprotein-Fraktion durch zusätzliche Lipidanlagerung seine Dichte erniedrigt und so zu einem Low-density-Lipoprotein wird. Daß es zu einem Austausch von Lipiden zwischen den einzelnen Lipoproteinfraktionen kommen kann, gilt als gesichert.

Um die bisher widersprüchlichen Befunde zu klären und das Plasmalipoproteinmuster, wie es sich bei der Cholestase zeigt, analysieren zu können, mußte eine Methode angewandt werden, die eine Fraktionierung der angereicherten LDL-Fraktion in Plasmalipoproteinklassen mit gleichen Apolipoproteinen ermöglicht. Eine solche Methode wurde von uns entwickelt (49). Gestützt auf eingehende chemische, physikochemische und immunologische Kriterien finden sich in der Plasma-LDL-Fraktion von Patienten mit histologisch und/oder anatomisch gesicherter Cholestase drei verschiedene Lipoproteine:

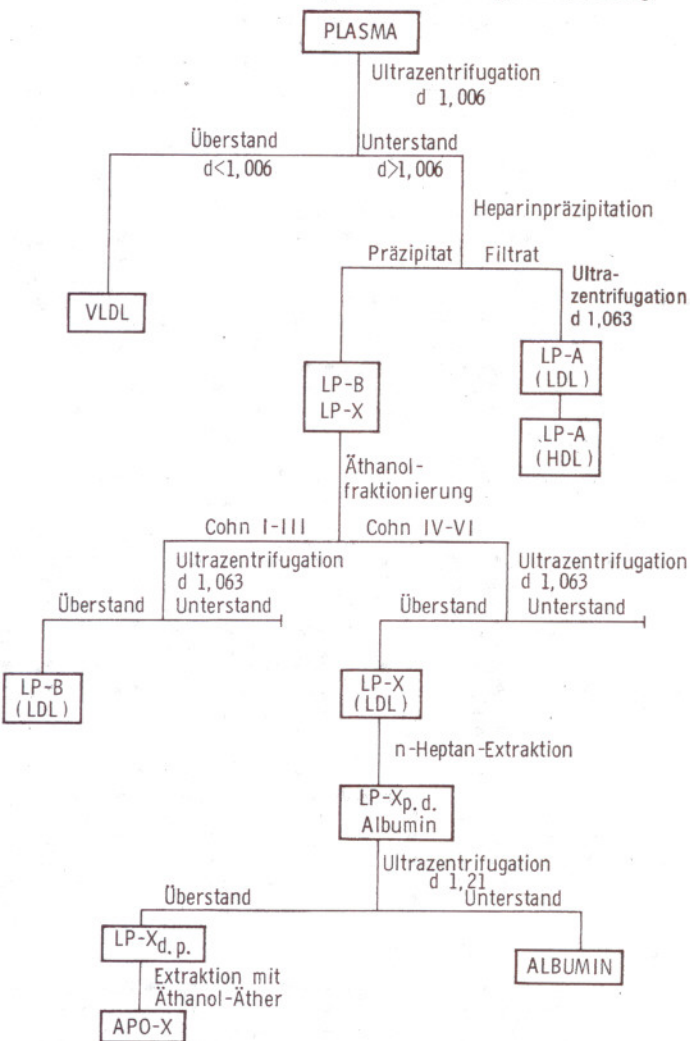
1. LP-A mit Apo A als Apolipoprotein,
2. LP-B mit Apo B als Apolipoprotein und
3. ein Lipoprotein mit einem Apolipoproteinanteil, der verschieden von Apo A und Apo B ist. Wir bezeichnen dieses abnorme Apolipoprotein als Apo X.

Isolierungsweg des LP-X

Zur Isolierung des LP-X (Tabelle 3) wurde als Ausgangsmaterial Plasma von Patienten verwendet, bei denen ein gesicherter Gallengangsverschluß oder eine histologisch gesicherte intrahepatische Cholestase vorlag. Die Blutproben wurden mindestens vier bis fünf Stunden, meistens zehn Stunden nach einer Mahlzeit entnommen.

Der erste Schritt der Lipoproteinfraktionierung bestand in einer Isolierung der Very-low-density-Lipoproteine unter Verwendung der

Tab. 3. Schematische Darstellung der LP-X- und Apo-X-Isolierung



präparativen Ultrazentrifuge (Spinco-Modell L). Das Plasma wurde im Verhältnis (v/v) 6/5 mit 0,15 mol NaCl überschichtet und mit 105 000 x g 22 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Die obere Schicht – sie enthält die Very-low-density-Lipoproteine – wurde durch Schneiden der Zentrifugentuben vom Restplasma getrennt. Die Plasmafraktion mit einer Dichte $d > 1,006$ g/ml wurde durch eine Hepa-

rinpräzipitation weiter fraktioniert. Hierzu wurden die von Burstein und Samaille (12, 15) beschriebenen Methoden zur β -LP-Präzipitation leicht abgewandelt (49). Im Präzipitat finden sich LP-B und LP-X, während LP-A ausschließlich im Überstand immunologisch nachweisbar ist. Durch eine fraktionierte Ultrazentrifugation des Überstandes bei den Dichten d 1,063 und d 1,21 g/ml läßt sich das LP-A der Low- und High-density-Lipoproteine quantitativ isolieren und bestimmen. Die mit dem Präzipitat gewonnene Lipoproteinfraktion wurde zur Trennung des LP-X vom LP-B einer Äthanolfraktionierung¹ unterworfen (16). Hiernach findet sich das LP-B in der Cohn-Fraktion I-III und das LP-X in der Cohn-Fraktion IV-VI. Sowohl die Cohn-Fraktion I-III als auch die Cohn-Fraktion IV-VI wurden anschließend einer Ultrazentrifugation bei einer Dichte von d 1,063 g/ml bei $105\,000 \times g$ 48 h unterworfen, um die beiden Low-density-Lipoproteine LP-B und LP-X von anderen, durch die Präzipitation nicht abtrennbaren Plasmaproteinen zu reinigen.

Im Gesamtplasma wie in den isolierten Lipoproteinfraktionen wurden das Gesamtcholesterin, das freie Cholesterin, die Triglyceride, die Phospholipide und der Proteingehalt bestimmt. Methodische Einzelheiten finden sich bei Seidel und Mitarbeitern (49). Die immunologische Charakteristik der isolierten Lipoproteinfraktionen und des Gesamtplasmas wurde nach der Ouchterlony-Methode (44) in einer Immundiffusion und/oder unter Verwendung einer Immunelektrophorese untersucht. Hierzu wurde ein 10/oiger Agargel mit einem Veronal-Puffer (pH 8,6; Ionenstärke 0,05) hergestellt. Als Antiseren wurden im Falle von anti- α -Lipoprotein-, anti- β -Lipoprotein-, anti-Albumin-, anti- γ -Globulin- und anti-Humanserum Antiseren der Firma Behring-Werke, Marburg/Lahn, im Falle von anti-LP-X-Serum wurde eigens hergestelltes Antiserum verwendet. Methodische Einzelheiten sind bei Seidel und Mitarbeitern (49) angegeben.

Mit Hilfe dieses Isolationsweges und der analytischen Methoden war es möglich, das Plasmalipoproteinmuster bei Patienten mit gesicherter Cholestase zu ermitteln. Es ist charakterisiert durch

1. einen absoluten Konzentrationsabfall des LP-A und somit der HDL-(High-density-Lipoprotein-)Fraktion,
2. durch einen Konzentrationsanstieg der LDL-(Low-density-Lipoprotein-)Fraktion und
3. dadurch, daß sich in der LDL-Fraktion neben LP-A und LP-B ein abnormes, als LP-X bezeichnetes Lipoprotein findet (Abbildung 1).

¹ Obwohl die Äthanolpräzipitation nicht, wie von Cohn beschrieben, auf Plasma, sondern auf die Plasmafraktion mit einer Dichte $d > 1,006$ g/ml angewendet wurde, soll im folgenden von Cohn-Fraktionen gesprochen werden.

Das LP-X ist chemisch und immunologisch verschieden von LP-A und LP-B; sein Auftreten ist die Ursache des Konzentrationsanstiegs der LDL-Fraktion. Der prozentuale Anteil von LP-B und LP-X zusammen in der Dichteklasse $d\ 1,006-1,063\ \text{g/ml}$ beträgt mehr als 95%, von LP-A weniger als 5%, bezogen auf das Protein. Das LP-B/LP-X-Verhältnis ist von Patient zu Patient verschieden und hängt wahrscheinlich vom jeweiligen Grad der Gallenabflußstörung ab.

Charakterisierung des LP-X

Die Protein-Lipid-Zusammensetzung des LP-X war in allen unseren Präparationen nahezu konstant und ist somit offensichtlich unabhängig von der absoluten Menge des LP-X im Plasma der Patienten (Tabelle 4). Sie zeichnet sich aus durch einen hohen Gehalt an Phospholipiden und freiem Cholesterin sowie durch einen für ein Low-density-Lipoprotein sehr niedrigen Gehalt an Protein. Dies hat ein ungewöhnlich hohes Phospholipid/Protein-Verhältnis zur Folge. Die Lipidanalyse der zwei Hauptlow-density-Lipoproteine, des LP-B und des LP-X, zeigt (Tabelle 4), daß die abnormen Lipidwerte der LDL-Fraktion und somit auch des Plasmas bei Patienten mit gesicherter Cholestase durch die abnorme Protein-Lipid-Zusammensetzung des LP-X bedingt sind. Die LP-B-, LP-A-, VLDL- wie die HDL-Fraktionen zeigen nur unbedeuten-

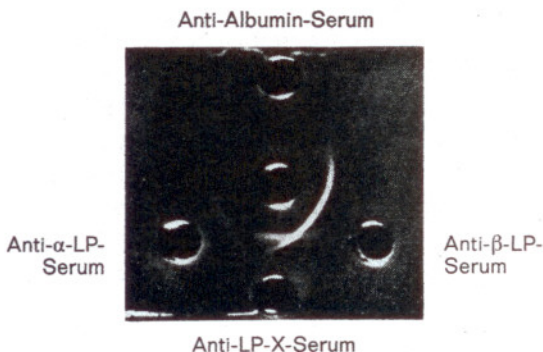


Abb. 1. Immundiffusion einer LDL- ($d\ 1,006-1,063$ -)Fraktion eines Patienten mit Verschlußikterus in 1%igem Agargel. Das Antigen befindet sich im Zentrum.

Tab. 4. Prozentuale Protein-Lipid-Zusammensetzung der LDL-, LP-B- und LP-X-Fractionen, isoliert aus dem Plasma von Patienten mit extrahepatischem Verschlußikterus. Die Werte stellen den Prozentanteil der jeweiligen Komponente am Gesamt-Lipoprotein dar. In Klammern sind die jeweils höchsten und niedrigsten Werte aus fünf Einzelbestimmungen angegeben

| Fraktion | Cholesterin- ester | freies Cholesterin | Phospholipide | Triglyceride | Protein | Phospholipide/ Protein |
|----------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| LDL** | 15,9 39,4* (11,0 - 20,2) | 19,4 7,5* (13,0 - 21,7) | 38,8 23,1* (32,1 - 41,4) | 6,5 9,3* (5,5 - 7,2) | 19,4 20,7* (12,0 - 21,6) | 2,0 1,1* (1,60 - 3,30) |
| LP-B | 27,3 (21,9 - 34,0) | 13,9 (9,0 - 19,0) | 26,5 (19,1 - 33,0) | 5,9 (3,8 - 12,9) | 26,4 (15,1 - 27,2) | 0,94 (0,84 - 1,21) |
| LP-X | 2,4 (0,9 - 3,7) | 22,4 (18,3 - 28,0) | 66,5 (62,0 - 70,2) | 2,9 (1,5 - 5,7) | 5,8 (4,6 - 7,2) | 11,5 (9,8 - 12,1) |

* Normalwerte

** Die LDL-Fraktion wurde durch Heparinpräzipitation gewonnen und enthält daher nur LP-B und LP-X.

de Normabweichungen in ihrer Lipidzusammensetzung (49). In Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge (42) fanden wir S_f -Werte für LP-X zwischen 16 und 17.

Das elektrophoretische Verhalten von LP-X ist nicht einheitlich in allen Medien. Während es auf Papier, in Stärkegel, in Agarose und Polyacrylamid eine Mobilität zeigt, die der normaler β -Lipoproteine ähnlich ist, wandert es in Agargel zur Kathode (Abbildung 2). Hierin unterscheidet es sich grundlegend von allen anderen bekannten Lipoproteinen. Daß es sich beim LP-X jedoch nicht um ein γ -Globulin handeln kann, beweisen seine Dichte, sein Lipidanteil und die Tatsache, daß es nicht mit anti- γ -Globulin-Serum immunologisch reagiert. Eben-sowenig reagiert LP-X mit anti-Human-Serum, wenn es mit Nüchternplasma gesunder Kontrollpersonen hergestellt ist (Abbildung 3).

Charakterisierung des Proteinanteils des LP-X (Apolipoprotein-X)

Obgleich das isolierte und rein dargestellte LP-X nur mit anti-LP-X-Serum immunologisch reagiert, findet sich nach

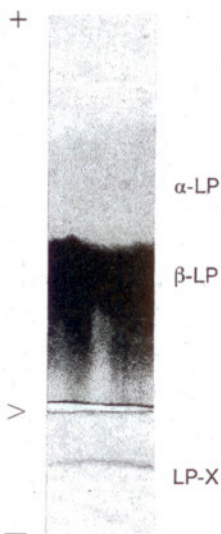


Abb. 2. Lipoprotein-Elektrophorese des Plasmas eines Patienten mit extrahepatischem Verschlusßikterus in 1%igem Agargel. Es wurde mit Öl-Rot-O angefärbt.

partieller Delipidation mit n-Heptan – hierbei werden die Neutralfette abgespalten – zusätzlich Albumin neben dem spezifischen Proteinanteil. Die Trennung des Albumins von dem spezifischen Proteinanteil des LP-X ist uns mit Hilfe einer Ultrazentrifugation bei einer Dichte von d 1,21 g/ml gelungen (4). Im Überstand findet sich das spezifische Protein des LP-X, im Unterstand das Albumin. Es ist bemerkenswert, daß dem Albumin konstant 40% des Proteins am LP-X zukommt und seine antigene Determinante durch Neutralfette im intakten LP-X-Molekül blockiert zu sein scheint. Es ist bisher kein Lipoprotein beschrieben worden, in dem das Albumin einen so wesentlichen Teil am Molekül ausmacht. Inwieweit das Albumin mitbestimmend ist bei der Lipidzusammensetzung des LP-X, ist noch ungeklärt. Der konstante Anteil des Albumins am LP-X spricht aber für eine bedeutende Rolle bei der Struktur und dem Stoffwechsel des LP-X.

Wird das partiell delipidierte und albuminfreie LP-X mit einem Äthanol-Äther-Gemisch total delipidiert, so erhält man ein wasserlösliches Apolipoprotein-X, das nur mit anti-LP-X-Serum immunologisch positiv reagiert. Die elektrophoretische Mobilität des Apo X ist gegenüber dem LP-X verändert. Sie liegt auch in Agargel wie in anderen Medien in der α_1 -Globulin-Albumin-Region (Abbildung 4). Das Apo X enthält weniger als 0,1% Phospholipide, keine anthronpositiven Kohlenhydrate und unterscheidet sich sowohl in seinen terminalen Aminosäuren als auch in seiner Aminosäurezusammensetzung von

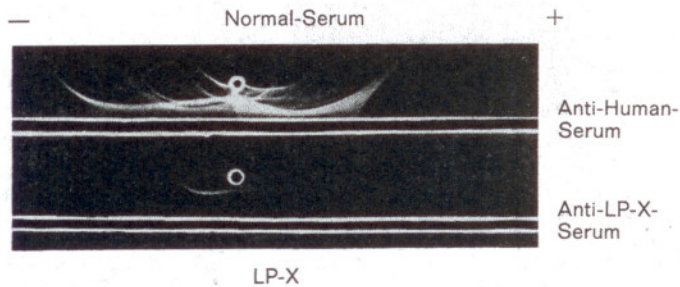


Abb. 3. Immunelektrophorese eines Kontrollserums und einer isolierten LP-X-Fraktion in 1% Agargel.

Apo A und Apo B (4, 49). Immunologisch reagiert Apo X wie LP-X nicht mit Antiseren gegen LP-A oder LP-B, hingegen fanden wir eine positive Reaktion mit anti-VLDL-Serum (Abbildung 5). Wir konnten darüber hinaus zeigen (4), daß es die Apo-C-Komponente² der Very-low-density-Lipoproteine ist, die immunologisch wie chemisch eine Verwandtschaft, wenn nicht Identität zum Apo X zeigt. Gegen eine volle Identität spricht die Tatsache, daß LP-X und LP-C in der Immundiffusion nur eine partielle Identität

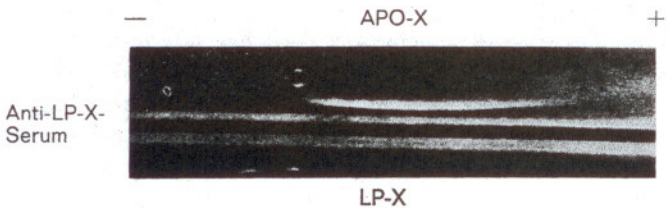


Abb. 4. Immunelektrophorese von Apo X und LP-X in 1%igem Agargel.

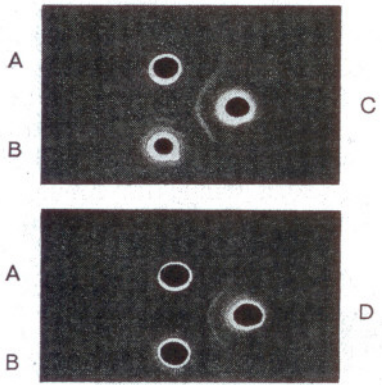


Abb. 5. Immundiffusion in 1% Agargel. A = anti-LP-X-Serum, B = anti-LP-C-Serum, C = Plasma eines Patienten mit erhöhter Konzentration der VLDL-Fraktion, D = Plasma eines Patienten mit Verschlußikterus.

² Beim Apo C handelt es sich um die dritte Proteinkomponente, die sich neben dem Apo A und dem Apo B in der Prä- β -Lipoprotein- und Chylomikronenfraktion findet. Das Apo C wurde erstmals von Gustafson und Mitarbeitern (27) isoliert und charakterisiert.

tität aufweisen (Abbildung 6). Ob es vorwiegend strukturelle Unterschiede zwischen dem LP-C und LP-X sind, die zu dieser immunologisch partiellen Identität führen, kann im Augenblick noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Es ist denkbar, daß bei solchen Strukturunterschieden der hohe Phospholipidgehalt im LP-X eine Rolle spielt.

Da in den Abbildungen 5–7 Vollserum verwendet wurde, zeigen diese Befunde erstmalig, daß der LP-C-Teil am Very-low-density-Lipoprotein in der intakten Lipoproteinfraktion nachweisbar ist und nicht erst nach Delipidation. Dies wurde bislang angenommen. Die LP-C-Komponente läßt sich im intakten Very-low-density-Lipoprotein, in den Prä- β -Lipoproteinen, den Chylomikronen und dem sogenannten Floating- β des Typ III einer Hyperlipoproteinämie nachweisen. Möglichkeiten, diese Befunde in der Differentialdiagnose der Hyperlipoproteinämie zu ver-

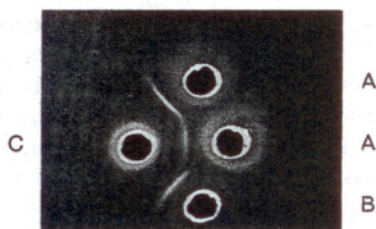


Abb. 6. Immundiffusion in 1% Agargel. A = Plasma eines Patienten mit Verschußikterus, B = Plasma eines Patienten mit erhöhter Konzentration der VLDL-Fraktion, C = anti-LP-X-Serum.

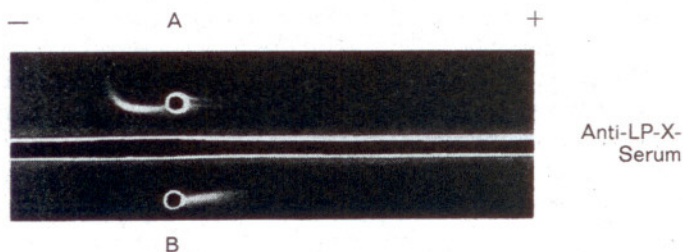


Abb. 7. Immunelektrophorese in 1% Agargel. A = Plasma eines Patienten mit Verschußikterus, B = Plasma eines Patienten mit erhöhter Konzentration der VLDL-Fraktion.

werten, werden im Augenblick von uns geprüft. In Abbildung 7 zeigt sich die unterschiedliche Mobilität des LP-C im Very-low-density-Lipoprotein zu dem LP-X, das wie oben demonstriert, ein abnormes Low-density-Lipoprotein mit einer kathodischen Mobilität in der Agarose-Elektrophorese darstellt. Dieser besonderen Mobilität des LP-X kommt als differentialdiagnostische Methode beim Ikterus eine besondere Bedeutung zu (50, 51).

Diskussion

Die Anwendung des neuen Isolierungsweges, bestehend aus einer Kombination von Ultrazentrifugation, Heparinpräzipitation und Cohn-Fraktionierung, gestattet eine weitere Fraktionierung der Low-density-Lipoproteine. Die Methode ermöglicht die Isolierung sowie eine quantitative und qualitative Bestimmung aller in der LDL-Fraktion enthaltenen Lipoproteine (LP-A, LP-B, LP-X) und die Analyse ihrer Protein- und Lipid-Komponenten. Sie ist in dieser Hinsicht allen bisher beschriebenen Isolierungsmethoden überlegen.

Die Protein-Lipid-Zusammensetzung des LP-X ist ausschlaggebend für die pathologischen Plasmalipidwerte und die ungewöhnliche Protein-Lipid-Zusammensetzung der LDL-Fraktion bei Patienten mit Cholestase. Dies wird bestärkt durch die Tatsache, daß die isolierten LP-A und LP-B eine nahezu normale Protein-Lipid-Zusammensetzung haben. Das LP-X ist durch einen hohen Gehalt an Phospholipiden und freiem Cholesterin ausgezeichnet, und es sind allein diese Lipide, die im Gesamtplasma sowie in der LDL-Fraktion bei Patienten mit Cholestase von der Norm abweichen.

Inwieweit die Plasmakonzentration des LP-X von dem Grad des Gallenverschlusses abhängt, kann noch nicht endgültig beantwortet werden. Hierzu laufen Untersuchungen an Tiermodellen. Da bekannt ist (43), daß Gallensäuren einen hemmenden Einfluß auf das lipolytische System in der Leber ausüben, könnte eine solche Hemmung auch beim Verschlußikterus eine Rolle spielen und Ursache oder Teilursache der Hyperlipoproteinämie dieser Patienten sein. Das Fehlen der Galle im Intestinaltrakt

scheint keine Rolle in diesen Mechanismen zu spielen, da sich gezeigt hat (45), daß Patienten mit einer Gallenfistel keine abnormen Plasmalipidwerte aufweisen. LP-X scheint auch nicht mit dem Gallensaft oder dem Urin ausgeschieden zu werden. Mit immunologischen Methoden konnten wir es weder in der Nativgalle, noch in der partiell delipidierten Galle, noch im Urin eines Patienten nachweisen, der eine hohe LP-X-Konzentration im Plasma hatte. LP-A und LP-B hingegen fanden sich im Gallensaft. Außer im Plasma konnten wir LP-X bisher nur im Aszites von Patienten mit Cholestase ermitteln.

Der Abfall der HDL-Fraktion kommt wahrscheinlich nicht primär durch die Gallenstauung, sondern durch eine sekundäre Leberschädigung zustande. Dafür sprechen die Befunde, die eine Erniedrigung der HDL-Konzentration bei Leberstörungen jeglicher Art anzeigen. Dies ist verständlich, da der Hauptteil der High-density-Lipoproteine, wenn nicht alle, in der Leber synthetisiert wird (11, 41). Es ist hingegen wahrscheinlich, daß die Gallenstauung in der Leber einen direkten Einfluß auf die Synthese und den Stoffwechsel des LP-X hat.

Die Stoffwechselbeziehungen und die Frage der Identität zwischen LP-C und LP-X sind nicht nur im Hinblick auf die pathophysiologischen Zusammenhänge bei der Hyperlipoproteinämie im Verlauf der Cholestase von zentralem Interesse, sondern vielleicht auch bei der weiteren Suche nach der Rolle der Lipoproteine und insbesondere der Apolipoproteine bei Fettstoffwechselstörungen.

Die Untersuchungen wurden zum Teil durch Zuwendungen des U.S. Public Health Service (HE-6221, HE-7005, HE-2528), durch die Oklahoma Heart Association, durch die American Heart Association und die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Zusammenfassung

Mit Hilfe einer neuen Isolierungstechnik, bestehend aus einer Kombination von Ultrazentrifugation, Heparinpräzipitation und Äthanolfraktionierung, ist es gelungen, aus dem Plasma von Patienten mit cholestatischem Ikterus ein abnormes, als LP-X bezeichnetes Lipoprotein zu isolieren und qualitativ wie quantitativ zu bestimmen. Die Protein-

Lipid-Zusammensetzung des LP-X ist gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an Phospholipiden ($\sim 65\%$) und einen geringen Proteinanteil ($\sim 6\%$). Nahezu das gesamte Cholesterin des LP-X liegt als freies Cholesterin vor. Die ungewöhnliche Protein-Lipid-Zusammensetzung des LP-X ist der bestimmende Faktor für die pathologischen Plasmalipidwerte in dieser Gruppe von Patienten. Der Proteinanteil des LP-X besteht zu 40% aus Albumin und zu 60% aus dem spezifischen Apolipoprotein-X, das sich chemisch wie immunologisch von dem Proteinanteil der α - und β -Lipoproteine unterscheidet. Mit immunologischen Methoden wird eine zumindest partielle Identität zwischen dem LP-X und dem in der VLDL-Fraktion enthaltenen LP-C aufgezeigt. Die Möglichkeit, spezifische Antikörper gegen LP-X herzustellen, ist ein neuer Beitrag zur Differentialdiagnose des Ikterus.

Summary

An abnormal low-density lipoprotein in obstructive jaundice.

I. Isolation and characterization

An abnormal lipoprotein, designated LP-X, was isolated from plasma of patients with obstructive jaundice and defined qualitatively and quantitatively by a new isolation technique which consisted of a combination of ultracentrifugation, heparin precipitation and ethanol fractionation. The protein-lipid combination of LP-X was characterized by a high content of phospholipids (about 65%) and a low protein content (about 6%). Almost all of the total cholesterol was present as free cholesterol. This unusual protein-lipid combination of LP-X was the decisive factor responsible for the abnormal plasma-lipid values in this group of patients. The protein portion of LP-X consisted of 40% albumin and 60% of the specific apolipoprotein-X, which chemically and immunologically was different from the protein portion of alpha and beta lipoproteins. Immunological methods demonstrated at least partial identity of LP-X and the LP-C contained in VLDL fraction. The possibility of producing a specific antibody against LP-X provides a new contribution to the differential diagnosis of jaundice.

Literatur

(1) Ahrens jr., E. H., H. G. Kunkel:
The relationship between serum lipids and skin xanthoma in 18 patients with primary biliary cirrhosis. *J. clin. Invest.* 28 (1949), 1565.
(2) Ahrens jr., E. H., H. G. Kunkel:
The stabilization of serum lipid emul-

sion by serum phospholipids. *J. exp. Med.* 90 (1949), 409.

(3) Alaupovic, P.: Recent advances in metabolism of plasma lipoproteins: chemical aspects. *Progr. biochem. Pharmacol.* 4 (1968), 91.
(4) Alaupovic, P., D. Seidel, W. J. McConathy, R. H. Furman: Identification of the protein moiety of an abnor-

- mal human plasma low-density lipoprotein in obstructive jaundice. *FEBS-Letters* 4 (1969), 113.
- (5) Balfour, W. M.: Human plasma phospholipid formation: a study made with the acid of radiophosphorus. *Gastroenterology* 9 (1947), 686.
- (6) Barr, D. P., E. M. Russ, H. A. Eder: Protein-lipid relationships in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions. *Amer. J. Med.* 11 (1951), 480.
- (7) Bragdon, J. H., R. J. Havel, E. Boyle: Human serum lipoproteins. I. Chemical composition of four fractions. *J. Lab. clin. Med.* 48 (1956), 36.
- (8) Brown, W. V., R. I. Levy, D. S. Fredrickson: Studies on the proteins of the very low-density lipoproteins. *Fed. Proc.* 28 (1969), 666.
- (9) Brown, W. V., R. I. Levy, D. S. Fredrickson: Studies of the proteins in human plasma very low-density lipoproteins. *J. biol. Chem.* 244 (1969), 5687.
- (10) Buckley, J. T., T. J. Delahunty, D. Rubinstein: The relationship of protein synthesis to the secretion of the lipid moiety of low-density lipoproteins by the liver. *Canad. J. Biochem.* 46 (1968), 341.
- (11) Bungenberg de Jong, J. J., J. B. Marsh: Biosynthesis of plasma lipoproteins by rat liver ribosomes. *J. biol. Chem.* 243 (1968), 192.
- (12) Burstein, M.: Isolation of human serum β -lipoproteins. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 255 (1962), 605.
- (13) Burstein, M., J. Caroli: Lipoprotéines sériques anormales au cours de certains icères par rétention. *Rev. franç. Étud. clin. biol.* 12 (1967), 898.
- (14) Burstein, M., J. Caroli: Isolement et étude des lipoprotéines sériques anormales au cours de icères par rétention après flocculation par le polyvinylpyrrolidone. *Rev. franç. Étud. clin. biol.* 13 (1968), 387.
- (15) Burstein, M., J. Samaille: A rapid separation of α - and β -lipoproteins. *Clin. chim. Acta* 5 (1960), 609.
- (16) Cohn, E. J., F. R. N. Gurd, D. M. Surgenor, B. A. Barnes, R. K. Brown, G. Derouaux, J. Gillespie, M. Kahnt, F. W. Lever, W. F. Liu, C. H. Mittleman, R. F. Mouton, K. Schmid, E. Uroma: A system for the separation of the components of human blood: quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma. *J. Amer. chem. Soc.* 72 (1950), 465.
- (17) Eder, H. A., E. M. Russ: Plasma-protein-lipid relationship in acute hepatitis. *J. clin. Invest.* 32 (1953), 564.
- (18) Eder, H. A., E. M. Russ, R. A. R. Pritchett, M. M. Wilber, D. P. Barr: Protein-lipid relationships in human plasma: in biliary cirrhosis, obstructive jaundice and acute hepatitis. *J. clin. Invest.* 34 (1955), 1147.
- (19) Faloona, G. R., B. N. Stewart, M. Fried: The effect of actinomycin D on the biosynthesis of plasma lipoproteins. *Biochemistry* 7 (1968), 720.
- (20) 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 (1967), 273.
- (21) Fried, M., H. G. Wilcox, G. R. Faloona, S. P. Eoff, M. S. Hoffman, D. Zimmermann: The biosynthesis of plasma lipoproteins in higher animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 25 (1968), 651.
- (22) Friedman, M., S. O. Byers, R. H. Rosenman: Lipogenic hypercholesterolemia. A guide for reorientation in the consideration of lipid-cholesterol relationships. *Arch. intern. Med.* 116 (1965), 807.
- (23) 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 (1954), 586.
- (24) 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 (1957), 713.
- (25) Gofman, J.: The Serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis, and coronary artery diseases. *Plasma (Milano)* 2 (1954), 484.
- (26) Goddridge, A. G., E. G. Ball: The effect of prolactin on lipogenesis in the pigeon. *In vivo studies. Biochemistry* 6 (1967), 1676.
- (27) Gustafson, A., P. Alaupovic, R. H. Furman: Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. Separation and characterization of phospholipid-protein residues obtained by partial delipidization of very low-density lipoproteins of human serum. *Biochemistry* 5 (1966), 632.
- (28) Havel, R. J., H. A. Eder, J. H. Bragdon: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally sepa-

- rated lipoproteins in human serum. *J. clin. Invest.* 34 (1955), 1345.
- (29) Jackson, R. S., C. F. Wilkinson jr., E. A. Hand, A. M. Waldron, W. C. Vogel: The relationship between the phospholipids and the cholesterol in human plasma and lymph. *Proc. Rudolf Virchow Med. Soc. New York* 11 (1952), 99.
- (30) Kunkel, H. G., E. H. Ahrens jr.: The relationship between serum lipids and the electrophoretic patterns, with particular reference to patients with primary biliary cirrhosis. *J. clin. Invest.* 28 (1949), 1575.
- (31) Kunkel, H. G., R. J. Slater: Lipoprotein patterns of serum obtained by zone electrophoresis. *J. clin. Invest.* 31 (1952), 677.
- (32) DeLalla, L., L. Levine, R. K. Brown: Immunologic studies of human high density lipoproteins. *J. exp. Med.* 106 (1957), 261.
- (33) Lee, D. M.: Physical, chemical and immunochemical characterization of human plasma low density lipoproteins. Dissertation (Oklahoma 1967).
- (34) Lee, D. M., P. Alaupovic: Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Isolation, composition and immunological characterization of low density lipoprotein subfractions of human plasma. *Biochemistry* 9 (1970), 2244.
- (35) Lemaire, A., G. Etienne, J. Etienne, J. Polonovski, E. Housset, J. Cottet: Un nouveau test biologique de la cholestase. *Presse méd.* 78 (1965), 3245.
- (36) Lindgren, F. T., A. V. Nichols: In: *The Plasma Proteins*. Bd. III (New York 1960).
- (37) Di Luzio, N. R., S. J. Riggi: Participation of hepatic parenchymal and Kupffer-cells in chylomikron and cholesterol metabolism. In: *The R.E.S. and Atherosclerosis* (New York 1967), S. 382.
- (38) McConathy, W., P. Alaupovic: persönliche Mitteilung (1968).
- (39) McGinley, J., H. Jones, J. Gofman: Lipoproteins and xanthomatous diseases. *J. invest. Derm.* 19 (1952), 71.
- (40) Mahley, R. W., R. L. Hamilton, V. S. Liquire: Characterization of lipoprotein particles isolated from the Golgi apparatus of rat liver. *J. Lipid Res.* 10 (1969), 433.
- (41) Marsh, J. B.: The incorporation of amino acids into soluble lipoproteins by cell-free preparations from rat liver. *J. biol. Chem.* 238 (1963), 1752.
- (42) Mills, G. L., D. Seidel, P. Alaupovic: Ultracentrifugal characterization of a lipoprotein occurring in obstructive jaundice. *Clin. chem. Acta* 26 (1969), 239.
- (43) Olson, A. C.: The lipolytic activities of rat liver. Dissertation (Oklahoma 1967).
- (44) Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels. *Acta pathol. microbiol. scand.* 32 (1953), 231.
- (45) Philips, G. B.: The lipid composition of serum in patients with liver disease. *J. clin. Invest.* 39 (1960), 1639.
- (46) Pierce, F. T., J. W. Gofman: Lipoproteins, liver disease, and atherosclerosis. *Circulation* 4 (1951), 25.
- (47) Russ, E. M., J. Raymunt, D. P. Barr: Lipoproteins in primary biliary cirrhosis. *J. clin. Invest.* 35 (1956), 133.
- (48) Seidel, D.: Die Physiologie der Plasmalipoproteine. *Int. J. clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. Sonderheft* (1969), 33.
- (49) 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 (1969), 1211.
- (50) Seidel, D., P. Alaupovic, R. H. Furman: Studies on a low-density lipoprotein characterizing obstructive jaundice. In: *Second International Symposium on Atherosclerosis*, Chicago 1969 (Berlin-Heidelberg-New York 1970).
- (51) Seidel, D., E. A. Schmitt, P. Alaupovic: Ein abnormes Low-density-Lipoprotein bei Cholestase. II. Bedeutung in der Differentialdiagnose des Ikterus. *Dtsch. med. Wschr.* 95 (1970), im Druck.
- (52) Shore, B., V. Shore: Heterogeneity in protein subunits of human serum high-density lipoproteins. *Biochemistry* 7 (1968), 2773.
- (53) Shore, V., B. Shore: Some physical and chemical studies on two polypeptide components of high-density lipoproteins of human serum. *Biochemistry* 7 (1968), 3396.
- (54) Shore, B., V. Shore: Isolation and characterization of polypeptides of human serum lipoproteins. *Biochemistry* 8 (1969), 4510.
- (55) Smith, S. C., R. L. Scheig, G. Klatskin, R. I. Levy: Lipoprotein abnormalities in liver disease. *Clin. Res.* 15 (1967), 330.
- (56) Stein, Y., O. Stein: Biosynthesis of lipoproteins. In: *Second International Symposium on Atherosclerosis*, Chicago 1969 (Berlin-Heidelberg-New York 1970).

(57) Stein, O., Y. Stein, D. S. Goodman, N. H. Fidge: The metabolism of chylomicron ester in rat liver. A combined radioautographic-electron microscopic and biochemical study. *J. Cell. Biol.* 43 (1969), 410.

(58) Switzer, S.: Plasma lipoproteins in liver disease. I. Immunologically distinct low-density lipoproteins in patients with biliary obstruction. *J. clin. Invest.* 46 (1967), 1855.

Dr. D. Seidel; Dr. P. Alaupovic
Medizinische Universitätsklinik
69 Heidelberg, Bergheimer Str. 58