Die α_3 -Globulinfraktion des Serums in der Dichtegradienten-Elektrophorese

Von A. DELBRÜCK, D. HOCK und H. DEICHER¹⁾

Aus der Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. F. Hartmann) und dem Institut für Biometrie und Medizinische Dokumentation (Direktor: Prof. Dr. B. Schneider) der Medizinischen Hochschule Hannover

(Eingegangen am 24. April 1968)

Nach präparativer Darstellung der 5 Fraktionen der elektrophoretischen Serumauftrennung im Saccharosedichtegradienten wurde eine immunologische Differenzierung der Proteine der sogenannten „ α_3 “-Globulinfraktion durchgeführt. Durch Nachweis typischer α_2 -Globuline wurde die Zugehörigkeit der im „ α_3 “-Globulinbereich wandernden Proteine zur α_2 -Globulinfraktion aufgezeigt. Haptoglobin wandert abhängig von dem Grad der Hämoglobinbeladung in der α_2 - bzw. „ α_3 “-Globulinfraktion. In Übereinstimmung mit diesen Befunden ließ eine statistische Analyse eines Kollektives normaler und pathologischer Seren weder eine Korrelation der Meßgrößen für die α_2 - wie die „ α_3 “-Globulinfraktion noch eine Beziehung der Meßwerte der „ α_3 “-Globulinfraktion zur klinischen Diagnose erkennen. Eine gesonderte Auswertung der als „ α_3 “-Globuline erscheinenden Fraktion ist unzweckmäßig.

Die α_2 - und „ α_3 “-Globuline sollten aufgrund unserer Ergebnisse als α_2 -Globuline zusammengefaßt werden. Eine klinische Bedeutung kann der α_3 -Globulin-Fraktion nach dem vorliegenden Material ebenfalls nicht zugemessen werden.

Density gradient electrophoresis of the α_3 -globulin fraction of serum

Serum was separated into five fractions on a preparative scale by electrophoresis in a sucrose density gradient. The proteins of the so-called „ α_3 “-globulin fraction were differentiated immunologically, and they were found to consist of typical α_2 -globulins. Haptoglobin migrates with the α_2 - or „ α_3 “-globulin fractions, depending on the amount of haemoglobin present. In agreement with these findings, a statistical analysis of a collective of normal and pathological sera showed no correlation between the measured amounts of α_2 and „ α_3 “, and no relationship between the amount of the „ α_3 “-globulin fraction and clinical diagnosis. A separate determination of the „ α_3 “-globulin fraction has no value. On the basis of the present results, the α_2 - and „ α_3 “-globulins should be considered as one fraction; this fraction was still without clinical significance in the studies reported here.

Zur Automation der elektrophoretischen Fraktionierung von Serumproteinen griffen SKEGGS und HOCHSTRASSER (1) auf die trägerfreie Zonenelektrophorese im Saccharosedichtegradienten nach BRAKKE (2) zurück. Die mit der Dichtegradiententechnik erzielten Elektropherogramme von Serumweißkörpern weichen von denjenigen, die mit Hilfe der üblichen Standardverfahren gewonnen werden, ab: Während die α_1 -Globuline im Albuminbereich wandern, stellt sich im α_2 - β -Globulinbereich ein zusätzlicher Gipfel dar, der von HOCHSTRASSER und SKEGGS (3) den α -Globulinen zugerechnet und als „ α_3 “-Globulinfraktion bezeichnet wurde (Abb. 1).

Für die klinische Interpretation der Elektropherogramme ist die Kenntnis der biochemischen Natur und des diagnostischen Aussagewertes der Serumweißfraktionen notwendig. Wir haben daher die 5 Fraktionen nach präparativer elektrophoretischer Trennung im Dichtegradienten isoliert und immunologisch auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht. Weiterhin wurde der diagnostische Aussagewert der Abtrennung der „ α_3 “-Globulinfraktion anhand der Auswertung von 596 Elektropherogrammen normaler und pathologisch veränderter Seren überprüft.

Material und Methoden

Präparative elektrophoretische Darstellung der Albumin- und Globulinfraktion in Anlehnung an HOCHSTRASSER und SKEGGS (3). Saccharosedichtegradient, Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,9, Ionenstärke 0,03, 180 mA, 140–160 V, Laufzeit 4 Std. Fraktionierung unter gleichzeitiger Proteinkonzentrationskontrolle im registri-

renden Durchflußkolorimeter Uvicord II (LKB-Produkte, Stockholm). Die den einzelnen Gipfeln zugehörigen Proteinfraktionen wurden zu jeweils 3 Portionen vereint und unter Vakuum gegen 0,9proz. NaCl-Lösung dialysiert und eingengt.

Abb. 1
Elektropherogramm des Serums vom Menschen
a) Trennung in der Autophorese (Technicon)
b) Ausflußdiagramm nach präparativer Trennung im Saccharose-Dichtegradienten
(a) und b) Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,9

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Automatische Elektrophorese im Saccharosedichtgradienten nach SKEGGS und HOCHSTRASSER (1)². Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,9, Ionenstärke 0,03, 140 V, 30 mA, Frequenz 4 Trennungen/Std.

Hämoglobinbeladung des Haptoglobins: Einem Teil der Seren wurde vor Elektrophoresebeginn 1,5 mg Hämoglobin/ml Serum zur Haptoglobinsättigung zugesetzt.

Darstellung der Proteinkomponenten der einzelnen isolierten Serum-eiweißfraktionen nach Refraktionierung in der Agar-Gel-Immun-elektrophorese nach SCHEIDEGGER (4) unter den üblichen Bedingungen (Veronal-Natriumacetat-Puffer, pH 8,2, Ionenstärke 0,05, Feldstärke 12–15 V/cm, Laufzeit 90 Min., Shandon Elektrophoreseapparatur, Shandon Labortechnik GmbH Frankfurt/M.) unter Verwendung von Anti-Humanserum vom Kaninchen (Behringwerke AG, Marburg/L.). Der Nachweis typischer Anteile in den einzelnen Fraktionen wurde durch spezifische Antiseren (Behringwerke AG, Marburg/L.) gegen folgende Serumproteine geführt:

α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, Gc-Globulin, Transferrin, β -1a/1c-Globulin, β -Lipoprotein, β -Glykoprotein, Immunglobuline G, A und M sowie Albumin.

Um für die Aussage über den Nachweis oder das Fehlen der oben genannten Proteine in den einzelnen Fraktionen vergleichbare Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden jeweils entsprechende Proteinkonzentrationen der 5 isolierten Fraktionen zur immunoelektrophoretischen Untersuchung eingesetzt.

Zur **Auswertung der Elektropherogramme** im Hinblick auf die Korrelation der Meßwerte für die α_2 - und „ α_3 “-Globulinfraktionen und die Beziehung zwischen den Meßwerten für die „ α_3 “-Globulin-

3. „ α_3 “-Globulin

4. β -Globulin

5. γ -Globulin

zeigte für die β - und γ -Globulinfraktionen eine zur Papier-, Celluloseacetat- oder Agar-Gel-Elektrophorese analoge Verteilung der Serumproteine. Alle Fraktionen enthielten eine geringe Menge Albumin, ein Hinweis auf die unvollständige Trennung in der angewandten Methode. Abweichend hiervon und in Übereinstimmung mit den Befunden von HOCHSTRASSER und SKEGGS (3) fanden sich im Albuminbereich (Fraktion 1) typische α_1 -Globuline: α_1 -Antitrypsin und α_1 -Lipoprotein wurden regelmäßig in dieser Fraktion nachgewiesen. Auch die weiteren, zu den α_1 -Globulinen gehörigen Proteine fanden sich, wie ihre Darstellung mit Anti-Humanserum beweist (Abb. 2) in der Fraktion 1 gemeinsam mit dem Albumin.

Die Fraktionen 2 und 3 (α_2 - bzw. „ α_3 “-Globulin nach SKEGGS) enthielten typische α_2 -Globuline, die, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration, stets mit Hilfe der spezifischen Antiseren u. a. für Haptoglobin, Coeruloplasmin, α_2 -Makroglobulin und Gc-Globulin nachweisbar waren (Abb. 3, Abb. 4). Durch die Er-

Abb. 2
Immunelektrophoretische Untersuchung der Albumin-Fraktion mit verschiedenen Antiseren. Neben dem Albumin-Präzipitat erkennt man deutlich die Präzipitattbögen von α_1 -Antitrypsin, α_1 -saurem Glykoprotein und α_1 -Lipoprotein

Antiseren
Anti-Humanserum
Anti-Albumin-Kaninchenserum

Antigen
Albumin-Fr.
unverdünnt
1:20
1:10

fraktion und den klinischen Diagnosen wurden 596 Seren in der Autophorese getrennt. Die Ergebnisse wurden einer statistischen Analyse unterzogen, wobei einer Normalgruppe von 199 Seren eine Gruppe von 397 pathologisch veränderten Seren gegenübergestellt wurde. Die letztere umfaßte 18 Untergruppen, die jeweils die Befunde bei einzelnen Krankheitsgruppen repräsentierten:

Anaemie, Gastritis, nichtentzündliche Magenleiden, akute Hepatitis, chronische Hepatitis, Lebercirrhose, Fettleber, entzündliche Gallenblasen- und Gallengangserkrankungen, Infektionskrankheiten, chronische Pyelonephritis, chronische Polyarthrit, weitere akut- und chronisch-entzündliche Erkrankungen, maligne Tumoren, Stoffwechselleiden ohne Diabetes mellitus, Diabetes mellitus, endokrine Erkrankungen und Vergiftungen. Zusätzlich wurde durch multivariate-statistische Analyse (5, 6) die Wertigkeit des „ α_3 “-Globulin-Parameters für die Interpretation der Elektropherogramme ermittelt (7).

Ergebnisse

Die immunologische Untersuchung der 5 isolierten Serumproteinfraktionen:

1. Albumin- α_1 -Globulin
2. α_2 -Globulin

²) Autophorese, Technicon Corp., Ardsley, (Chauncey), N. Y., USA.

gebnisse der Kreuzabsorptionsversuche wird diese Aussage eindeutig bestätigt: Die zweimalige Absorption von Anti-Humanserum mit Fraktion 2 bzw. 3-Proteinen führte bei der Austestung gegen die entsprechende Fraktion in der Immunelektrophorese zum Verschwinden aller Präzipitationslinien, d. h. beide Fraktionen enthielten identische Proteine, so daß durch sie die Antikörper restlos absorbiert wurden (Abb. 5). Das Haptoglobin nahm in den Ergebnissen unserer Untersuchungen eine Sonderstellung ein: Während in nicht mit Hämoglobin beladenem Serum im α_2 -Globulinbereich eine deutliche, im „ α_3 “-Globulinbereich jedoch nur eine sehr zarte Präzipitationslinie mit Anti-Haptoglobin auftrat, führte eine Hämoglobinbeladung des Serums vor der Elektrophorese zum Auftreten eines intensiven Präzipitates auch in der 3. Fraktion („ α_3 “-Globulin) (Abb. 6). Die parallele Auftrennung der Seren in der Autophorese zeigte eine entsprechende Zunahme der Fraktion 3 nach Beladung des Serums mit Hämoglobin, verglichen mit der Ausprägung dieser Fraktion bei der Auftrennung nicht mit Hämoglobin beladenen Serums (Abb. 7).

Die statistische Analyse einer Gruppe von Elektropherogrammen, die mit der Autophoresetechnik ge-

Abb. 3

Immunoelektrophoretische Untersuchung der α_2 -Fraktion mit verschiedenen Antiseren. Die Fraktion enthält kein α_1 -Antitrypsin und kein Transferrin. Auf jedem Plättchen ist zum Vergleich im Antigenreservoir 1 ein Normalserum aufgetragen. Antigen 2 = isolierte α_2 -Fraktion

Alle Fraktionen enthalten als „Schlepp“ eine geringe Menge Albumin

Abb. 4

Immunoelektrophoretische Untersuchung der α_3 -Fraktion mit verschiedenen Antiseren. Die Fraktion enthält kein β -Lipoprotein, jedoch eine geringe Menge Transferrin als Verunreinigung. Auf jedem Plättchen ist zum Vergleich im Antigenreservoir 1 ein Normalserum aufgetragen. Antigen 3 = α_3 -Fraktion

Alle Fraktionen enthalten als „Schlepp“ eine geringe Menge Albumin

Abb. 5
Ergebnis eines Kreuzabsorptionsversuchs. Einzelheiten siehe Text

Antigene:
1 = Kontroll-Normalserum
2 = α_3 -Fraktion He 1
3 = „ α_3 “-Fraktion He 1

Antiseren:
A = Anti-Humanserum, 2 $\times$ absorbiert mit isolierter „ α_3 “-Fraktion He 1
B = Anti-Humanserum, 2 $\times$ absorbiert mit isolierter α_2 -Fraktion He 1

Abb. 6
Immunoelektrophoretische Untersuchung von α_2 - und „ α_3 “-Fraktionen eines Serums ohne (α_2 , „ α_3 “) und mit (α_2 Hb, „ α_3 Hb“) Hämoglobinsättigung. Man sieht deutlich das stärkere Haptoglobinsättigung in der „ α_3 “-Fraktion („ α_3 Hb“) des mit Hämoglobin versetzten Serums

Abb. 7
Elektropherogramm des Serums vom Menschen nach Trennung in der Autophorese (Technicon)
a) Serum ohne Hämoglobinsättigung des Haptoglobins
b) Serum nach Hämoglobinsättigung des Haptoglobins (1,5 mg Hb/ml Serum)

wonnen wurden, ließ weder im Normbereich noch bei pathologischen Veränderungen eine Korrelation der Werte der α_2 -Globuline mit denjenigen der „ α_3 “-Globulinfraktion erkennen. Der Korrelationskoeffizient für die Gesamtheit der Elektropherogramme ($n = 596$) betrug dabei $-0,0485$. In den einzelnen Krankheitsgruppen variierte der Korrelationskoeffizient zwischen ± 0 und $-0,403$ bzw. $+0,775$.

Ein quantitativer Unterschied im „ α_3 “-Globulinanteil der Serumproteine zwischen Elektropherogrammen von Normalpersonen und Erkrankten war nicht nachweisbar. Die Mittelwerte der „ α_3 “-Globulinfraktion der Normalgruppe betrug 3,46%, in den einzelnen Krank-

heitsgruppen schwankte er zwischen 2,8% und 4,0%. Der Mittelwert für die „ α_3 “-Globulinfraktion aller untersuchten Seren ist mit 3,49% mit dem der Normalgruppe nahezu identisch.

Mit diesem Ergebnis stimmt das Resultat der multivariaten-statistischen Analyse der Elektropherogramme gut überein, das für die Variable „ α_3 “-Globulin kein bestimmendes Gewicht für die diagnostische Aussage erkennen ließ.

Diskussion der Ergebnisse

Die Saccharosedichtegradienten-Elektrophorese hat sich in Form der Autophoreseapparatur vorteilhaft für die Rationalisierung und die Automation im Routinelaboratorium erwiesen. Durch ihr breites Auflösungsvermögen im γ -Globulinbereich ermöglicht diese Methode eine Ausweitung der diagnostischen Aussage (8, 9). Diesen Vorteilen steht die Schwierigkeit in der Interpretation der Auftrennung im Albumin- α -Globulinbereich gegenüber, welche von derjenigen der üblichen Trägerelektrophoresen abweicht. Die immunologische Analyse der isolierten Fraktionen der Saccharosedichtegradienten-Elektrophorese zeigt, wie zu erwarten, daß die wesentlichen Proteine der in der üblichen Elektrophoresetechnik abtrennbaren α_1 -Globulinfraktion in der Autophorese im Albuminbereich wandern. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit den Angaben von HOCHSTRASSER und

SKEGGS (3), die bei papierelektrophoretischer Auftrennung der isolierten Albuminfraction eine Bande im α_1 -Globulinbereich neben der Albuminbande aufgefunden. Es besteht jedoch weitgehende Übereinstimmung darüber, daß die Bestimmung der α_1 -Globulinfraktion in der Klinik wenig Bedeutung besitzt (10), so daß die Interpretation der Elektropherogramme durch das Fehlen einer α_1 -Globulinabtrennung nur unwesentlich beeinträchtigt werden dürfte. Aus den Untersuchungen der α_2 - und „ α_3 “-Globulinfraktionen geht hervor, daß — von quantitativen Abweichungen abgesehen — beide Proteinfractionen hinsichtlich ihres Proteingehaltes identisch waren. Diese Tatsache ergibt sich insbesondere aus den Kreuzabsorptionsversuchen, bei denen in den meisten Fällen nach Absorption der Antiseren mit der α_2 - bzw. „ α_3 “-Globulinfraktion keine Reaktion mehr mit der „ α_3 “- bzw. α_2 -Globulinfraktion beobachtet werden konnte. Diese Befunde wurden durch die Ergebnisse der Untersuchungen auf das Vorhandensein typischer Proteine der α_2 -Globulinfraktion mit Hilfe spezifischer Antiseren erhärtet. In keiner der beiden Fraktionen wurden — abgesehen von gelegentlichen Verunreinigungen — Proteine nachgewiesen, die nicht in der anderen Fraktion ebenfalls vorhanden waren. Schon dieser Befund berechtigt zu der Annahme, daß eine Auswertung der abgetrennten „ α_3 “-Globulinfraktion für klinische Belange keine Bedeutung besitzen dürfte. Eine gewisse Ausnahme hiervon bildet das Haptoglobin, ein Befund, auf den auch ROBINET (11) im Zusammenhang mit vergleichenden Untersuchungen von Seren in der Autophorese und der Immunelektrophorese hingewiesen hat. Mit Hämoglobin gesättigtes Haptoglobin wandert offenbar in der Autophorese-Technik deutlich langsamer als teilgesättigtes bzw. ungesättigtes Haptoglobin. Die immunelektrophoretischen Untersuchungen zeigten bei Hämoglobinsättigung daher ein deutliches Haptoglobinpräzipitat im α_2 - und „ α_3 “-Globulinbereich, während nicht mit Hämoglobin gesättigte Seren in der α_2 -Globulinfraktion ein wesentlich stärkeres

Haptoglobinpräzipitat als in der „ α_3 “-Globulinfraktion zeigten. Neben den durch eine unterschiedliche Hämoglobinbeladung bedingten Unterschieden in der Wanderungsgeschwindigkeit des Haptoglobins dürften auch die verschiedenen erblichen Varianten des Haptoglobins (11) aufgrund ihrer differenten Wanderungsgeschwindigkeiten für die Ausprägung der Haptoglobinpräzipitate im α_2 - bzw. „ α_3 “-Globulinbereich eine Rolle spielen.

Im Rahmen der elektrophoretischen Routineuntersuchungen kommt demnach unter den verschiedenen Faktoren, welche durch ihren Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit des Haptoglobins die Ausprägung der „ α_3 “-Globulinfraktion im Elektropherogramm bestimmen, der jeweiligen Hämoglobinbeladung des Haptoglobins die größte Bedeutung zu, da in Abhängigkeit von der Entnahmetechnik jedes Serum in mehr oder weniger großem Ausmaß Hämoglobin enthält.

Eine Korrelation der Meßwerte für die α_2 - und „ α_3 “-Globulinfraktionen ist unter diesen Bedingungen theoretisch nicht zu erwarten, da quantitative Veränderungen der α_2 -Globuline im Bereich der „ α_3 “-Globulinfraktion durch den jeweiligen Gehalt des Serums an Hämoglobin in der unterschiedlichsten Weise überdeckt werden können. In der Tat ergab sich aus der statistischen Auswertung unseres Materials weder ein gleichsinniges Verhalten der α_2 - und „ α_3 “-Globulinfraktionen noch ein typisches Verhalten der „ α_3 “-Globuline in bezug auf einzelne Krankheitsgruppen. Auch in der multivariaten statistischen Analyse der Elektropherogramme, die neben der Einzelaussage der Variablen auch deren gegenseitigen Zusammenhang berücksichtigt, besitzt die Variable „ α_3 “-Globulin kein bestimmendes Gewicht für die diagnostische Aussage.

Die Autoren danken Herrn Professor Dr. H. CLEVE, Division of Clinical Genetics, Department of Medicine, Cornell Univ. Med. School, New York, N. Y., USA, für die Überlassung der Hämoglobinpräparation.

Literatur

1. SKEGGS, L. T. und H. HOCHSTRASSER, *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 102, 144 (1962). — 2. BRAKKE, M. K., *Arch. Biochem. Biophysics* 55, 175 (1955). — 3. HOCHSTRASSER, H. und L. T. SKEGGS, *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 102, 161 (1962). — 4. SCHEIDEGGER, J. J., *Internat. Arch. Allergy* 7, 103 (1955). — 5. ANDERSON, T. W., *An introduction to multivariate statistical analysis*. Wiley & Sons, New York (1958). — 6. SCHNEIDER, B., *Biometrische Z.* 9, 269 (1967). — 7. DELBRÜCK, A. und D. HOCK, *Die Anwendung multivariater statistischer Methoden zur Auswertung von Laboratoriumsdaten*. Verhandlg. Deutsche Gesellsch. Med. Dokumentation u. Stat. 12. Jahrestagung Kiel 1967. F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1968 im Druck. — 8. BOHOUN, C. und J. C. DELARUE, *Elektrophoretische Untersuchungen im Sucrosegradienten in: Automation in analytical chemistry*. Technicon Symposium 1964, S. 195. Mediad Inc., New York (1964). — 9. HENKEL, E., R. HENKEL und A. DELBRÜCK, in Vorbereitung. — 10. WUHRMANN, F. und H. H. MÄRKI, *Dysproteinaemien und Paraproteinaemien*. Grundlagen, Klinik, Theorie. Schwabe & Co. Verlag, Basel/Stuttgart (1963). — 11. ROBINET-LEVY, M., *Comparaison des resultats d'electrophorese sérique obtenus au moyen de l'appareil Technicon, de l'electrophorese sur papier et de l'immuno-electrophorese*. in: *Automation in analytical chemistry*, Hrsg. L. T. Skeggs Technicon symposium 1966, S. 203. Mediad Inc. New York (1966). — 12. BEUNG, H., H. CLEVE und H. DEICHER, *Zschr. Hyg. Leipzig* 151, 291 (1965). — 13. SUNDERMAN, F. W. JR., *Clinical interpretation of fractions of serum proteins by sucrose density gradient electrophoresis*. in: *Automation in analytical chemistry*, Hrsg. L. T. Skeggs, Technicon Symposium 1965. Mediad Inc., New York (1965).

Priv.-Doz. Dr. A. Delbrück
3000 Hannover
Podbielskistr. 380