

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
8. Jg., S. 166—169, März 1970

## Quantitativer Vergleich der Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetat-Membranen mit der Fraktionierung von Lipoproteinen in der präparativen Ultrazentrifuge

*Lipoproteinelektrophorese auf Celluloseacetat-Membranen*

(3. Mitteilung)<sup>1)</sup>

Von U. H. KLEMENS und J. SCHMALBECK, unter der technischen Assistenz von EDDA HEIDRICH

*Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Steglitz  
und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin*

(Eingegangen am 28. November 1969)

Es wird ein quantitativer Vergleich der Lipoproteinfraktionen beschrieben, die mit der präparativen Ultrazentrifuge bzw. der Lipoprotein-Elektrophorese auf Celluloseacetat-Membranen gewonnen wurden. Dabei zeigen sich gute Korrelationen zwischen den VLDLP ( $S_r$  20 bis 400) und den prä- $\beta$ -Lipoproteinen, den LDLP und den  $\beta$ -Lipoproteinen, den HDLP und den  $\alpha$ -Lipoproteinen.

*Lipoprotein electrophoresis on cellulose acetate membranes, 3.*

*Quantitative comparison with the fractionation of lipoproteins in the preparative ultracentrifuge*

Lipoprotein fractions can be compared quantitatively with the aid of the preparative ultracentrifuge, or by lipoprotein electrophoresis on cellulose acetate membranes. Good correlations are obtained between the VLDLP ( $S_r$  20—400) and the pre- $\beta$ -lipoproteins; the LDLP and the  $\beta$ -lipoproteins; the HDLP and the  $\alpha$ -lipoproteins.

In verschiedenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die in der präparativen Ultrazentrifuge gewonnenen Lipoprotein-Fraktionen (1, 2, 3) sich bestimmten Banden der Lipoprotein-Elektrophorese zuordnen lassen (4, 5, 6). Die very low density Lipoproteine ( $S_r$  20—400)<sup>2)</sup> entsprechen den prä- $\beta$ - (oder  $\alpha_2$ -), die LDLP<sup>2)</sup> den  $\beta$ - ( $S_r$  0—20) und die HDLP<sup>2)</sup> den  $\alpha$ -Lipoproteinen. Die Lipidanteile der Lipoproteine lassen sich in den Ultrazentrifugenfraktionen quantitativ bestimmen. Mit der Lipoprotein-Elektrophorese sind dagegen nur qualitative oder semiquantitative Angaben möglich. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich quantitative Beziehungen zwischen diesen beiden Methoden nachweisen lassen.

### Methodik

#### *Arbeitsgang*

33 Personen (Normalpersonen, Hyperlipoproteinämien Typ II, III und IV) wurde nach 12stdg. Fasten venöses Blut entnommen, Gesamtlipid-, Cholesterin-, Phosphatid- und Triglycerid-Konzentrationen im Plasma bestimmt und zwei Lipoprotein- sowie eine Eiweiß-Elektrophorese durchgeführt.

Zweimal 4 ml Plasma jedes Patienten wurden mit der präparativen Ultrazentrifuge fraktioniert. Einzelheiten zum Arbeitsgang und Methoden zur Bestimmung der Gesamtlipide, Triglyceride, Phosphatide und Cholesterin wurden an anderer Stelle beschrieben (6).

<sup>1)</sup> 1. Mitteilung: diese Z. 7, 540 (1969); 2. Mitteilung: diese Z. 8, 162 (1970), vorstehend.

<sup>2)</sup> VLDLP = very low density Lipoproteine; LDLP = low density Lipoproteine; HDLP = high density Lipoproteine.

#### *Lipoprotein-Elektrophorese*

Vom Plasma und den verschiedenen Ultrazentrifugenfraktionen wurden jeweils 2 Elektrophoresen unter konstanten Bedingungen durchgeführt. Die Streifen wurden mit Ölrot 0 angefärbt und densitometrisch ausgewertet. Die Methode wurde bereits ausführlich beschrieben (7).

#### *Quantitative Berechnung*

Ölrot 0 färbt nur den Lipidanteil der Lipoproteine. Bei der densitometrischen Auswertung der Elektropherogramme wird demnach nicht die relative Konzentration der Lipoproteine, sondern die ihrer Lipidanteile bestimmt. Da die Summe der Lipidanteile der Konzentration der Gesamtlipide im Plasma gleichzusetzen ist (6), kann man die absolute Konzentration (K) der Lipidanteile der verschiedenen Lipoproteine nach folgender Formel berechnen:

$$K = \frac{\text{rel. Konzentration}}{100} \cdot \text{Gesamtlipid-Konz. (mg/100 ml Plasma)}$$

Vorausgesetzt wird dabei, daß das Ölrot 0 gegenüber den verschiedenen Lipidklassen einen weitgehend identischen Färbekoeffizienten hat.

#### *Präparative Ultrazentrifuge*

Jeweils 4 ml Plasma wurden auf eine Dichte von 1,006 bzw. 1,063 eingestellt und in der präparativen Ultrazentrifuge bei 105000 g 20 Stdn. lang zentrifugiert. Methodische Einzelheiten wurden bereits beschrieben (6). Die überstehenden Phasen enthalten die Lipoproteine, die spezifisch leichter sind als das Medium. Wir bezeichneten sie als Fraktion 1. Die unterstehende Phase enthält die spezifisch schwereren Lipoproteine (Fraktion 2). Demnach sind in der Fraktion 1 bei der Dichte  $d = 1,006$  die VLDLP ( $S_r$  20 bis 400), bei einer Dichte  $d = 1,063$  neben den VLDLP auch die LDLP ( $S_r$  0—20) enthalten; in der Fraktion 2 findet man bei der Dichte  $d = 1,006$  die LDLP und HDLP, bei einer Dichte von  $d = 1,063$  nur die HDLP. Wir bestimmten das Volumen und die Gesamtlipid-, Triglycerid-, Phosphatid- und Cholesterin-Konzentrationen jeder Fraktion. Außerdem wurde die Wiederfindung für

die verschiedenen Lipide berechnet; sie lag zwischen 82% und 102% der eingesetzten Lipidmengen. Die Lipidwerte in den einzelnen Ultrazentrifugenfraktionen wurden entsprechend ihrer Wiederfindung korrigiert.

#### Quantitative Berechnung

Wie bei der Lipoprotein-Elektrophorese wurden nicht die Lipoproteine, sondern nur ihre Lipidanteile quantitativ bestimmt. Die Plasmakonzentration (K) der Lipidanteile der VLDLP bzw. der HDLP kann aus der Fraktion 1 ( $d = 1,006$ ) nach der Formel

$$K = \frac{K_F \cdot V_F}{V}$$

berechnet werden.

Dabei bedeutet V das eingesetzte Plasmavolumen,  $V_F$  das Fraktionsvolumen und  $K_F$  die Gesamtlipidkonzentration in der Fraktion. Die Berechnung der Lipidanteile der LDLP ( $S_r 0-20$ ) ist umständlicher, da sie in keiner Fraktion rein vorliegen. Sie sind zusammen mit den HDLP in der Fraktion 2 ( $d = 1,006$ ) enthalten, können aber, da die HDLP aus der Fraktion 2 ( $d = 1,063$ ) quantitativ bestimmt werden können, nach folgender Formel berechnet werden:

$$K = \frac{K_1 \cdot V_1 - K_2 \cdot V_2}{V}$$

Dabei bedeutet K die gesuchte Konzentration im Plasma, V = das eingesetzte Plasmavolumen,  $K_1$  bzw.  $V_1$  die Gesamtlipidkonzentration bzw. das Volumen der Fraktion 2 ( $d = 1,006$ ) und  $K_2$  und  $V_2$  die entsprechenden Werte bei der Fraktion 2 ( $d = 1,063$ ). Die Plasmakonzentrationen der Lipidanteile der verschiedenen Lipoproteine wurden mit den entsprechenden Ergebnissen der Lipoprotein-Elektrophoresen verglichen.

#### Ergebnisse

Wir führten zwei Untersuchungen durch, die eine Kontrolle der Fraktionierung mit der präparativen Ultrazentrifuge erlaubten:

1. Von jeder Ultrazentrifugenfraktion wurden zwei Lipoprotein-Elektrophoresen zur Beurteilung ihres Reinheitsgrades durchgeführt. Traten bei der Lipoprotein-Elektrophorese Banden auf, welche nicht in die entsprechende Ultrazentrifugenfraktion gehörten, dann wurden diese Proben nicht weiterverwertet.

2. Diese Kontrolluntersuchung beruht auf der charakteristischen Zusammensetzung der verschiedenen Plasma-Lipoproteine. Bei den VLDLP ( $S_r 20-400$ ) überwiegen die Triglyceride, bei den LDLP ( $S_r 0-20$ ) das Cholesterin und bei den HDLP die Phosphatide. Wir bestimmten in jeder Ultrazentrifugenfraktion die Cholesterin-, Phosphatid- und Triglyceridanteile an der Gesamtlipidkonzentration. Die Ergebnisse von 15 untersuchten Normalpersonen sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Sie stimmen gut mit den von ONCLEY (8) angegebenen Werten überein. Die Lipidverteilung bei den Hyperlipoproteinämie-Typen entsprach im Prinzip den Werten der Normalpersonen.

Entsprachen die Ultrazentrifugenfraktionen den genannten Reinheitskriterien, dann wurden sie für den quantitativen Vergleich mit der Lipoprotein-Elektrophorese verwandt. Die 33 Fälle, bei denen dieser Vergleich vorgenommen wurde, rekrutierten sich aus 4 verschiedenen Gruppen (Normalpersonen, primäre Hyperlipoproteinämien Typ II, III und IV). Innerhalb der einzelnen Gruppen divergierten die Lipidkonzentrationen im Plasma ziemlich stark, so daß ein breites Spektrum erfaßt wurde. Die prozentuale Verteilung der Gesamtlipide auf die einzelnen Ultrazentrifugenfraktionen wurde berechnet: aus demselben Plasma wurden

Tab. 1

Lipidzusammensetzung der Plasmalipoproteine. Die Lipoproteinfraktionen wurden in der präparativen Ultrazentrifuge getrennt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Untersuchung von 15 Normalpersonen

Lipoprotein-Fraktion	Lipoprotein-Gesamtlipide (mg/100 ml Plasma)	Triglyceride	Lipidanteile (%) Cholesterin	Phosphatide
VLDLP ( $S_r 20-400$ )	90,9 ± 40,0	70,5 ± 9,7	20,9 ± 8,3	10,9 ± 5,3
LDLP ( $S_r 0-20$ )	315,5 ± 58,1	10,4 ± 2,9	51,6 ± 4,3	38,1 ± 3,2
HDLP	162,9 ± 37,8	11,7 ± 4,2	32,9 ± 5,1	56,0 ± 4,5

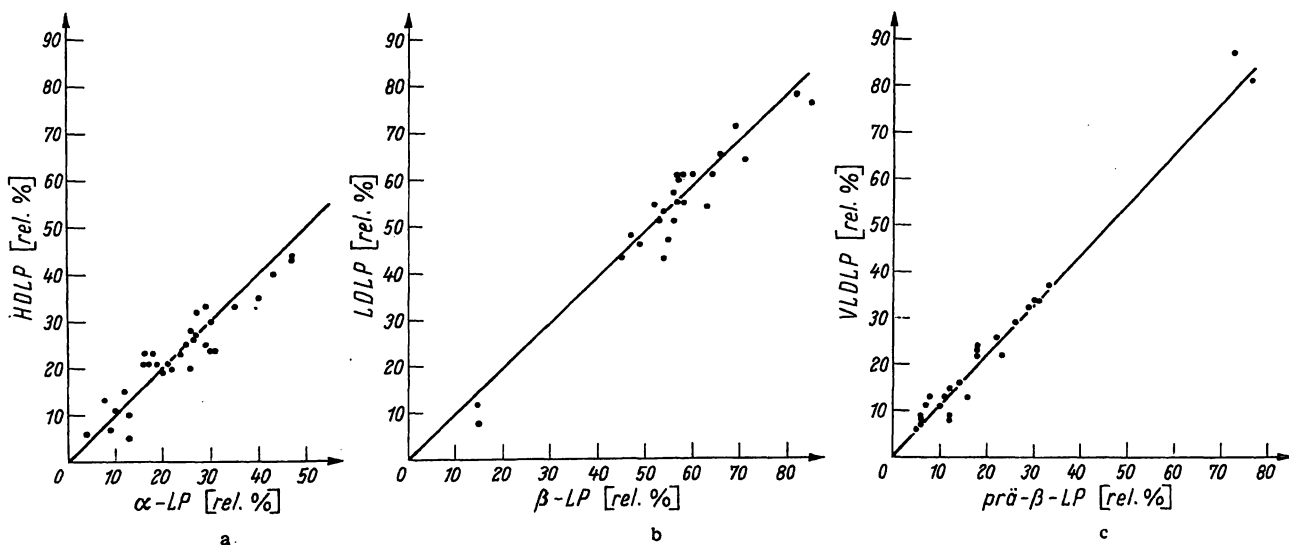


Abb. 1

Quantitativer Vergleich Ultrazentrifuge—Lipoproteinelektrophorese. Abszisse: Lipoproteinelektrophorese, relative Konzentrationen der Lipidanteile der  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder prä- $\beta$ -Lipoproteine. Ordinate: Ultrazentrifuge, relative Konzentrationen der Lipidanteile der HDLP, LDLP oder VLDLP  $\alpha$ -,  $\beta$ - und prä- $\beta$ -LP =  $\alpha$ -,  $\beta$ - und prä- $\beta$ -Lipoproteine

Tab. 2

Lipidkonzentration im Plasma und in den einzelnen Lipoproteinfraktionen. Aus jeder Gruppe wurden drei charakteristische Fälle ausgewählt. (N = Normalperson, II, III und IV: Hyperlipoproteinämie-Typen II, III und IV)

Name	Typ	Lipidkonzentration (mg/100 ml Plasma)				Konzentration des Lipidanteiles der Lipoproteine (mg/100 ml Plasma)					
		Tri-glyceride	Cholesterin	Phosphatide	Gesamt-lipide	VLDLP	prä- $\beta$ -LP	LDLP	$\beta$ -LP	HDLP	$\alpha$ -LP
Br.	N	128	236	201	565	131	102	286	316	148	147
No.	N	88	209	208	505	68	40	271	318	165	146
Oe.	N	40	196	231	467	0	0	279	266	188	201
Ho.	II	126	511	362	999	57	70	840	849	102	80
Ko.	II	105	300	231	636	70	71	430	452	135	114
Re.	II	106	318	297	721	54	87	517	487	151	137
Ge.	III	323	363	344	1030	423	—	244	—	367	412
Bo.	III	335	336	317	988	339	—	441	—	211	168
St.	III	1231	595	453	2279	1447	—	185	—	147	95
Le.	IV	208	173	201	582	214	192	303	314	58	76
Be.	IV	270	241	241	752	255	233	324	338	172	180
La.	IV	1084	323	352	1759	1425	1337	211	264	121	158

die relativen Konzentrationen der Lipidanteile der elektrophoretisch getrennten Lipoproteine bestimmt. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt die gute Korrelation beider Methoden (Abb. 1). Der Korrelationskoeffizient für das Paar: VLDLP—prä- $\beta$ -Lipoproteine betrug 0,990, für das Paar: LDLP— $\beta$ -Lipoproteine 0,965 und für das Paar: HDLP— $\alpha$ -Lipoproteine 0,940.

In der Tabelle 2 sind die Absolutwerte von jeweils 3 charakteristischen Fällen der untersuchten Gruppen zusammengestellt.

Weiterhin verglichen wir die Konzentrationen der Lipidanteile der VLDLP mit der Triglycerid-, der LDLP mit der Cholesterin- und der HDLP mit der Phosphatidkonzentration. Es ergab sich eine gute Korrelation zwischen VLDLP und Triglyceriden (Korrelationskoeffizient: 0,943) und zwischen LDLP und Cholesterin (Korrelationskoeffizient: 0,949). Zwischen der Phosphatidkonzentration und den  $\alpha$ -Lipoproteinen ließ sich keine gegenseitige Abhängigkeit feststellen (Korrelationskoeffizient: 0,352). Ähnliche Ergebnisse findet man bei der Lipoprotein-Elektrophorese (Abb. 2). Da weder Cholesterin noch Triglyceride ausschließlich in den  $\beta$ - bzw. prä- $\beta$ -Lipoproteinen transportiert werden, geht die Regressionsgerade in beiden Fällen nicht durch den Nullpunkt. Bei einer Triglyceridkonzentration von

40—50 mg/100 ml sind keine prä- $\beta$ -Lipoproteine im Plasma nachweisbar. Die Triglyceride werden dann allein von den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lipoproteinen transportiert. Ebenso kann man aus der Abbildung ersehen, daß Cholesterin bis zu 80 mg/100 ml im Plasma vorkommen kann, ohne an die  $\beta$ -Lipoproteine gebunden zu sein. Diesen Befund kann man z. B. bei A- $\beta$ -Lipoproteinämie erheben.

### Diskussion

Zwei wichtige Voraussetzungen müssen bei einem quantitativen Vergleich zwischen Lipoprotein-Elektrophorese und der Ultrazentrifugenmethode erfüllt sein:

1. die mit der Ultrazentrifuge dargestellten Lipoproteinfraktionen (S<sub>r</sub>-Klassen) müssen reproduzierbar bestimmten Lipoproteinbanden der Elektrophorese zugeordnet werden können.

2. Das Auflösungsvermögen beider Methoden muß so groß sein, daß die verschiedenen Lipoproteine vollständig voneinander getrennt werden.

Die Voraussetzungen sind bei der Lipoprotein-Elektrophorese auf Celluloseacetat-Membranen erfüllt, von 2 Ausnahmen abgesehen. Bei einer hochgradigen Hyperlipoproteinämie Typ IV mit Triglyceridwerten von 1500—2000 mg/100 ml im Plasma sieht man ein „tailing“

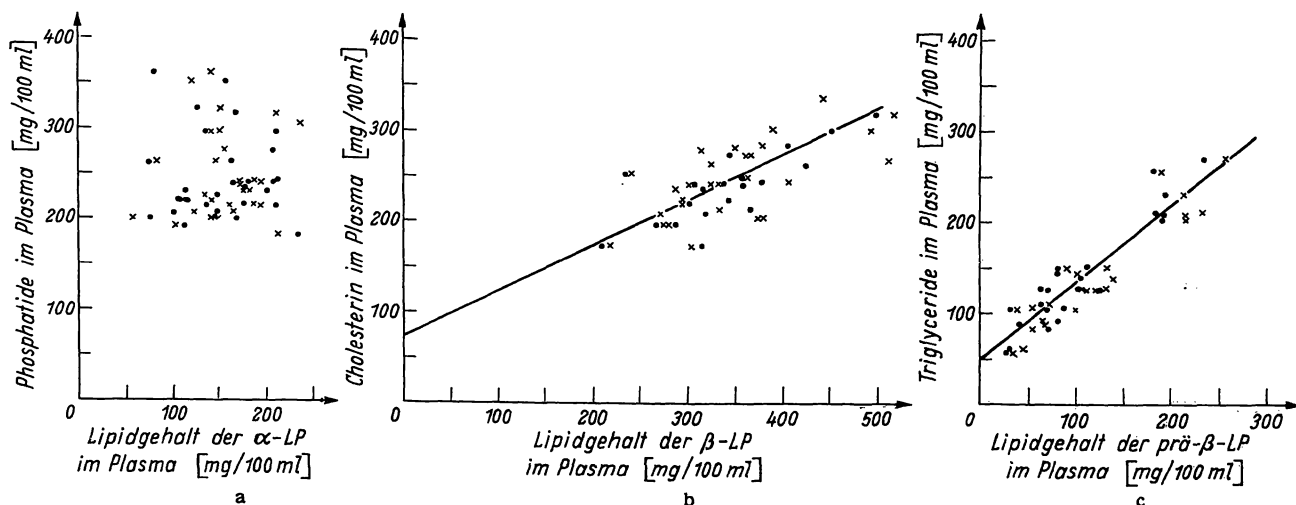


Abb. 2

Vergleich zwischen den Konzentrationen der Lipidanteile der verschiedenen Lipoproteine (Abszisse) und bestimmter Lipide im Plasma (Ordinate). Die Lipoproteine wurden entweder mit der präparativen Ultrazentrifuge (x) oder mit der Lipoproteinelektrophorese (o) fraktioniert. Fälle mit Hyperlipoproteinämie Typ III wurden in die Abbildung nicht aufgenommen.

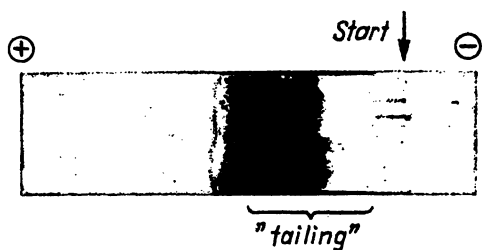


Abb. 3

Lipoproteinelektrophorese bei hochgradiger Hyperlipoproteinämie Typ IV. „Tailing“ der VLDLP zur Startlinie. Triglycerid-Konzentration: 2950 mg/100 ml Cholesterin-Konzentration: 395 mg/100 ml

der prä- $\beta$ -Lipoproteine zur Startlinie hin (Abb. 3), so daß die klaren Grenzen zwischen  $\beta$ - und prä- $\beta$ -Lipoproteinen verwischt werden. Bei der Hyperlipoproteinämie Typ III ist ebenfalls eine klare Trennung zwischen  $\beta$ -Lipoproteinen und dem atypischen Lipoprotein, welches als breite  $\beta$ -Bande sichtbar wird, nicht möglich. In der Ultrazentrifuge erhält man weitgehend reine

Lipoproteinfraktionen, was durch eine Lipoprotein-Elektrophorese einfach nachzuprüfen ist.

Bei dem quantitativen Vergleich ergaben sich Korrelationskoeffizienten, die alle nahe bei 1 lagen, d. h. beide Methoden korrelieren gut miteinander. Da außerdem die Steigungen der Regressionsgeraden annähernd 1 waren, muß der Färbekoeffizient von Ölrot O gegenüber den Lipidanteilen der verschiedenen Lipoproteine nahezu gleich groß sein. Es deutet sich demnach die Möglichkeit an, aus der Konzentration der Gesamtlipide im Plasma und der elektrophoretisch ermittelten relativen Konzentration der Lipidanteile (Ölrot O-Färbung) ihre absolute Konzentration in den einzelnen Lipoproteinfraktionen zu bestimmen. Endgültige Aussagen darüber sind aber erst nach größeren Untersuchungsreihen möglich.

Frau L. RICHTER und Herrn J. CROHM danken wir für ihre freundliche Mitarbeit.

#### Literatur

1. DE LALLA, O. F. und J. W. GOFMAN, Meth. Biochem. Analysis 7, 459 (1954). — 2. FURMAN, R. H., R. P. HOWARD, K. LAKSHMI und L. N. NORICA, Amer. J. Clin. Nutr. 9, 73 (1961). — 3. BRAGDON, J. H., R. J. HAVEL und E. BOYLE, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 48, 36 (1956). — 4. NOBLE, R. P., F. T. HATCH, J. A. MAZRIMAS, F. T. LINDGREN, L. C. JENSEN und G. L. ADAMSON, Lipids 4, 55 (1969). — 5. CHIN, H. P. und D. H. BLANKENHORN, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 20, 305 (1968). — 6. KLEMENS, U. H. und J. SCHMALBECK, diese Z. 8, 162 (1970). — 7. KLEMENS, U. H. und J. SCHMALBECK, diese Z. 7, 540 (1969). — 8. ONCLEY, J. L., Lipoproteins, in: Lipid Transport, S. 70, 122. Hrsg.: Meng, H. C., J. G. Coniglio, V. S. Lequire, G. V. Mann und J. M. Merrill, Thomas, Springfield (Ill.) (1964).

Dr. U. H. Klemens  
1000 Berlin 45  
Hindenburgdamm 30