

Die Serumgruppe LP: Zur Bestimmung des Typus und der Genfrequenzen*

HANS KLEIN, RUTHILT SCHUMACHER und REINHOLD GÜNTHER

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Verkehrsmedizin: Prof. Dr. H. KLEIN)
(Direktor: Prof. Dr. B. MUELLER)

Eingegangen am 26. September 1966

BERG (1963) hat für die von ihm beschriebene Serumgruppe Lp folgende Frequenzen für das noch als hypothetisch angesehene Gen Lp^a angegeben: Lp^{a+}:Lp^{a-} = 0,1877:0,8123. Über weitere Bestimmungen der Genfrequenzen berichteten BERG u. WENDT (1964), BUNDSCUH u. VOGT (1965), BERG, KAHLICH-KOENNER u. WEIPPL (1965). Die Schwankungen liegen innerhalb der bereits von BERG (1963) bestimmten Grenzen für Lp^{a-} = 0,7868 — 0,8378, obwohl inzwischen in Erweiterung der früheren Untersuchungen — die meist das von BERG (1963) angewandte Antiserum benutzten — die Bestimmungen auch mit anderen Antilipoproteineren durchgeführt wurden. In den eigenen Untersuchungen wurde ursprünglich mit einem von BUNDSCUH (1965) zur Verfügung gestellten Antiserum vergleichend mit zwei weiteren durch spezifische Absorption gewonnenen Antiseren bestimmt. Neben Lp(a) wurde gleichzeitig Lp(x) nach den Angaben von BUNDSCUH u. VOGT (1965) mituntersucht. Die Häufigkeit und Kombination von Lp(a) und Lp(x) in 421 Proben ergab einige Auffälligkeiten (Tabelle 1):

Tabelle 1. Lp(a), Lp(x): Häufigkeit und Kombination in 421 Proben

N	a ⁺	x ⁺	(a ⁺ x ⁺)	(a ⁻ x ⁺)	(a ⁺ x ⁻)	(a ⁻ x ⁻)
421	122 ¹	149	122	27	1 ²	272

¹ Unter diesen sind 3 Seren, die mit Anti-Lp^a Berlin positiv, mit Anti-Lp^a Heidelberg negativ waren.

² Nicht unter 421 mitgezählt.

Da die Kombination Lp(a+) Lp(x-) nur einmal beobachtet werden konnte, die geringe Differenz zwischen Lp(a+) und Lp(x+) die Vermutung erlaubt, der Unterschied könne darauf beruhen, daß mit dem möglicherweise stärkeren Antiserum Lp(x) mehr Lp(a+) erfaßt werden, wurden die Untersuchungen mit verschiedenen Antiseren unter gewissen Modifikationen — auf die noch näher einzugehen sein wird — fortgesetzt.

* Herrn Prof. Dr. B. MUELLER zur Vollendung des 68. Lebensjahres.

I. Material und Methoden

1. Antilipoproteinserum: Apatitmethode. Nach Angaben von BERG (1963) wurden vier verschiedene Seren unter Berücksichtigung der Methode von TISELIUS, HJERTÉN und LEVIN (1956) chromatographisch so aufgearbeitet, daß eine für β -Lipoprotein immunelektrophoretisch reine Fraktion gewonnen wurde. Diese wurde — insgesamt 30 ml für je ein Kaninchen — nur Immunisation benutzt, indem 5 Wochen lang je Woche an 3 Tagen annähernd 2 ml gegeben wurden. Dadurch wurde ein Antiserum erreicht, das immunelektrophoretisch und nach der Ouchterlony-Methode noch weitere Antikörper, nicht nur gegen Lipoprotein, enthielt. Nach Absorption mit verschiedenen menschlichen Lp(a $-$)-Seren gab diese Antiseren keine positiven Reaktionen gegen mindestens 20 verschiedene menschliche Seren.

2. Antilipoproteinserum: Sephadexmethode. Um die Schwierigkeiten der nicht immer einstellbaren Durchflußzeiten der Apatitsäule zu vermeiden, wurde versucht, an einer Säule mit Sephadex G 200 ein möglichst reines β -Lipoprotein zu isolieren. Dazu wurde ein Mischserum benutzt. Die lipoproteinhaltige Fraktion wurde entweder mittels Sephadex G 50 oder durch Dialyse konzentriert. Die Konzentration wurde so eingestellt, daß sie einer Serumverdünnung von etwa 1:1 entsprach. Mit einem Zusatz von 0,2 ml Liquemin wurde immunisiert. Die Immunelektrophorese und die Prüfung nach OUCHTERLONY ergab ein für Lipoprotein spezifisches Antiserum. Dieses Antiserum war — ebenfalls wie das nach der Apatitmethode erreichte — nach verschieden abgestufter Absorption mit mehreren Lp(a $-$)-Seren negativ gegen mehr als 20 menschliche Seren.

3. Antilipoproteinserum: Direkte Immunisation. Es wurden von zwei Lp(a $+$)-Personen frisches Serum — für jede Person ein Kaninchen — zur Immunisation benutzt. Die Immunisation erstreckte sich über mindestens 4 Wochen. Diese Kaninchen bildeten ein Antilipoproteinserum, das nach verschieden abgestufter Absorption mit einem Lp(a $-$)-Serum sich verhielt wie die nach der Apatitmethode von BERG (BERG, 1963; Tabelle 1) gewonnenen Antilipoproteinseren. Ein weiteres Kaninchen wurde mit einem Mischserum aus verschiedenen Lp(a $+$)-Personen immunisiert. Auch dieses Antiserum hatte dieselben Eigenschaften wie die beiden mit frischem individuellem Serum erzielten Antiseren.

4. Zur Absorptionstechnik. Es wurden je 1 ml Serum Lp(a $-$) mit Antiserum im Verhältnis zwischen 1:0,75 bis 1:1,75 oder, je nach dem Antiserum, 0,5:0,4 bis 0,5:0,9 gemischt, 1 Std bei 37°C gehalten, längere Zeit geschüttelt, zentrifugiert, abpipettiert. Um die günstigste Absorptionsstufe zu erreichen, wurden bekannte und möglichst gleiche Lp(a $+$)- und Lp(a $-$)-Seren geprüft. Die günstigste Absorptionsstufe wurde somit jeweils ermittelt.

5. Lp: Bestimmung nach OUCHTERLONY. Die Bestimmungen wurden auf 18:14 cm großen Glasplatten in einem nach OUCHTERLONY hergestellten 1% Difcoagar mit einem Phosphatpuffer pH 7,38 durchgeführt. Dadurch konnten auf jeder Platte 30 Seren gleichzeitig mit drei verschiedenen Lp(a) und einem Lp(x)-Antiserum untersucht, vergleichend für jedes Serum die unterschiedlich ausfallenden Präcipitationen besser erfaßt werden (Beispiel: Abb. 1 und 2). Die Platten wurden 48 Std bei 37°C in einer feuchten Kammer gehalten. Nach dieser Zeit konnten die Präcipitationen sicher nachgelesen werden. Fast alle Platten wurden zur Dokumentation in üblicher Weise nach CROWLE (1961) weiterbehandelt und teilweise mit Sudanschwarz, vorwiegend mit Ölrot gefärbt.

6. Zu den Bestimmungen wurde fast ausschließlich frisches, höchstens wenige Tage bei +4°C aufbewahrtes stets klares Serum benutzt. Damit ein möglichst gleichmäßiges Material untersucht werden konnte, wurde für die Bestimmungen, über die hier berichtet wird, nur Serum von Patienten, die weniger zur Behandlung,

meist zur Begutachtung im LVA-Sanatorium Königstuhl (Heidelberg) waren, herangezogen. Es handelt sich somit — im strengen Sinne — um kein auslesefreies Material.

II. Ergebnisse

1. Die an der Apatit- und Sephadexsäule isolierten immunelektronophoretisch reinen β -Lipoproteine wurden aus einem dem Typus Lp(a—) zugehörigen Serum gewonnen. Obwohl alle fünf mit dieser Fraktion immunisierten Kaninchen ein Antilipoproteinserum gebildet hatten, waren diese Antiseren trotz vielfach veränderter und unterschiedlich abgestufter Absorption, durchgeführt sowohl mit Lp(a+) wie mit Lp(a—)-Serum, im Diffusionstest gegen mindestens 20 verschiedene menschliche Seren negativ. Dadurch wird — obwohl dies aus den Untersuchungen von BERG (1963) schon hervorgeht — der besondere Charakter des Typus Lp(a+) bestätigt. Die Eigenschaft Lp(a+) wird bestimmt durch ein eigenständiges nicht in jedem Serum — mindestens nicht als Antigen wirksames — Protein. Das Antiserum ist kein einfaches Antilipoproteinserum, umgekehrt ist bewiesen, daß in einem Lp(a—)-Serum dieses Antigen nicht enthalten ist. Deshalb ist es verständlich, daß auch nach Immunisation mit einem frischen Lp(a+)-Vollserum durch entsprechende Absorption mit einem Lp(a—)-Vollserum ein spezifisches Antiserum gewonnen werden kann. Im Hinblick auf weitere Untersuchungen — über die noch berichtet wird — ist diese Tatsache auch von praktischer Bedeutung.

2. In Tabelle 1 wurde auf die geringe Differenz in der Häufigkeit zwischen Lp(a+) und Lp(x+) aufmerksam gemacht. Diese könnte sowohl durch schwach positive Lp(a) wie Lp(x) bedingt sein. Bereits BERG u. MOHR (1963) — später KAHLICH-KOENNER u. WEIPPL (1965) — heben die Schwierigkeiten bei der Unterscheidung schwacher Reaktionen hervor. Es wurde die Möglichkeit erwogen, Lp(a+) könne, wenn es sehr schwach sei, im Diffusionstest unterhalb der Sichtbarkeitsgrenze liegen. Die vergleichende Bestimmung von 60 Seren mit drei verschiedenen Lp(a)-Antiseren und ein Lp(x)-Antiserum läßt beträchtliche Schwankungen im Stärkegrad der positiven Reaktionen erkennen (Abb. 1). Es kann vorkommen, daß ein Serum, mit 4 verschiedenen Antiseren untersucht, gegen 2 negativ, gegen 2 weitere positiv ist. In Abb. 1 ist das mit Ha bezeichnete Antiserum im Verhältnis zu dem mit Mi bezeichneten durchgehend schwächer. Doch kann dies allein nicht der einzige Grund für den verschiedenen Stärkegrad der positiven Reaktionen sein, da einzelne Seren mit dem schwächeren Antiserum eine starke, mit dem stärkeren Antiserum eine schwächere Reaktion gaben.

Diese Unsicherheiten können teilweise dadurch behoben werden, daß nach der Absorption, wenn das Antiserum auf seine spezifischen Eigenschaften geprüft ist, dieses wieder so konzentriert wird, daß die durch

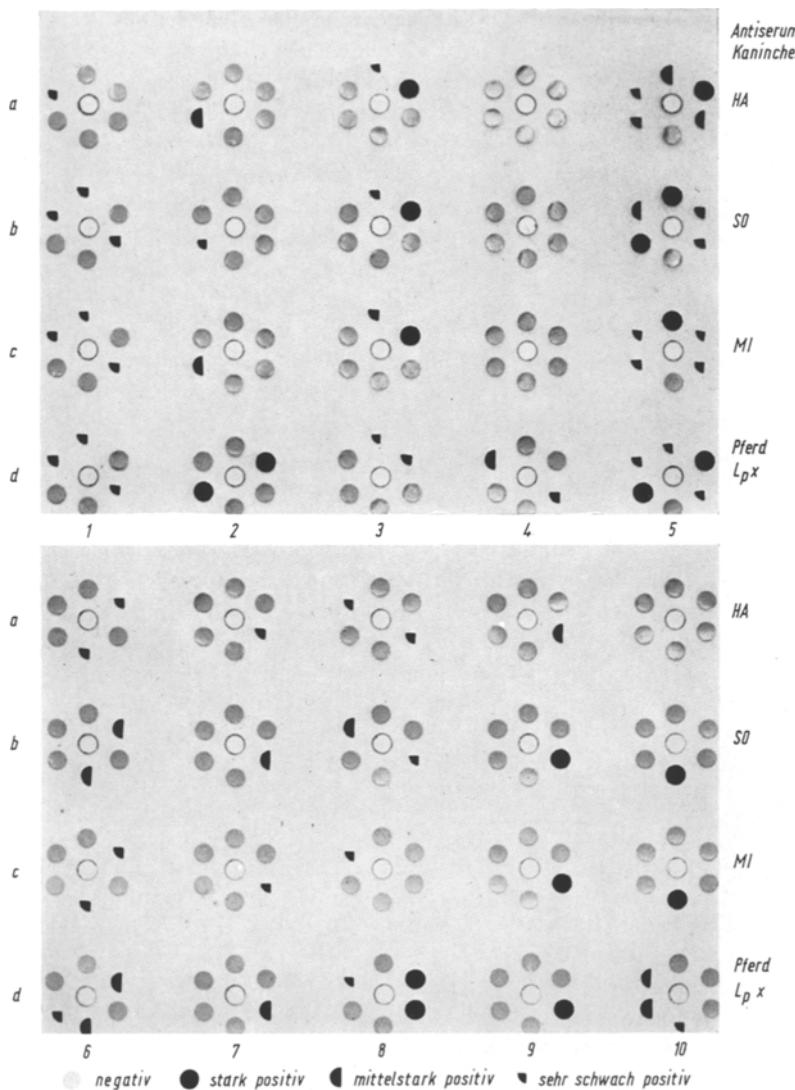


Abb. 1. Lp-Bestimmung mit Lp(x) und 3 verschiedenen Lp(a)-Seren: Ha, So und Mi. Identische Proben in den senkrechten Reihen mit unterschiedlichem Stärkegrad der Präcipitationen (zu beachten Reihe 5 und 10!).

die Absorption entstandene Antiserumverdünnung ausgeglichen wird. Die Konzentration des Antiseraums wurde durch Sephadex G 50 in Kombination mit einer Körbchenzentrifuge durchgeführt. In Abb. 2 wird der Unterschied zwischen den konzentrierten Antisera zu den nicht konzentrierten in Abb. 1 deutlich: Die schwachen und gelegentlich nur

schwierig beurteilbaren Reaktionen kommen nicht mehr vor. Die Diagnose wird dadurch einfacher und sicherer. Jedoch sind die erwähnten Schwierigkeiten nicht alle aufgehoben, da auch bei konzentriertem Antiserum, wenn vier verschiedene vergleichend miteinander benutzt werden, einzelne Seren keine Reaktion mit dem einen oder anderen Antiserum geben. In den hier durchgeföhrten Untersuchungen wurden nur die als Lp(a+) bezeichneten, die mindestens mit zwei Antiseren eine Präcipitation zeigten. In kritischen Fällen — vor allem unter gerichtsmedizinischen Gesichtspunkten — sollte deshalb der Typus mindestens mit vier verschiedenen und möglichst nach der Absorption konzentrierten Antiseren bestimmt werden.

3. Zur Frage, ob Lp(x) ein besonderer Typus des Lp-Systems ist, soll nicht Stellung genommen werden. BUNDSCUH u. VOGT (1965) haben für Lp(x+) aufgrund von 1404 Bestimmungen eine Genfrequenz von 0,1067 berechnet. Der Unterschied ist, wie erwähnt, nur geringfügig. Bei einem Vergleich der Häufigkeiten der positiven und negativen Reaktionen zwischen den mit Ha, So und Mi bezeichneten Antiseren — bereits aus den Beispielen in Abb. 1 und 2 möglich — würden sich vergleichbare Differenzen ergeben wie zwischen dem Antiserum Lp(a) und dem Antiserum Lp(x). Unter 1018 untersuchten Proben waren lediglich zwei, die mit Antiserum Lp(x) negativ-, mit drei Antiseren Lp(a)-positiv waren. Doch kommen auch ähnliche Beziehungen unter den drei verschiedenen Lp(a)-Antiseren vor.

Tabelle 2. *Lp(a), Lp(x): Häufigkeit und Kombination in 1018 Proben*

<i>N</i>	<i>Lp⁺</i>	<i>Lp⁻</i>	<i>Lp(a+)</i>	<i>Lp(x+)</i>	<i>Lp(a-)</i>	<i>Lp(x+)</i>
1018	346	672	283		63	

4. Die Einzelheiten der Untersuchung von 1018 Proben sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Genfrequenz für Lp ist $Lp^a : Lp^- = 0,1503 : 0,8497$. Die Frequenz für Lp^x — als besonderer Typus kritisch aufzufassen — würde $Lp^x : Lp^- = 0,1876 : 0,8124$ betragen. BERG, KAHLICH-KOENNER u. WEIPPL (1965) haben unter der Annahme von zwei Allelen für einen autosomalen Genort aufgrund einer ähnlichen Genfrequenz die Häufigkeit des Geno- und Phänotypus berechnet (Stichprobengröße: 310): Phänotypus Lp(a+) : Lp(a-) = 0,3125 : 0,6875. In Tabelle 3 sind zum Vergleich die Typenhäufigkeiten und Genfrequenzen von 2078 Proben zusammengestellt.

Die Frequenz für Lp^a ist niedriger als in den übrigen angeführten Untersuchungen. Über ähnliche Frequenzunterschiede in anscheinend gleichartigen Stichproben haben früher BAITSCH und LIEBRICH (1961) anläßlich ihrer Untersuchungen über die Allelenhäufigkeit von Hp be-

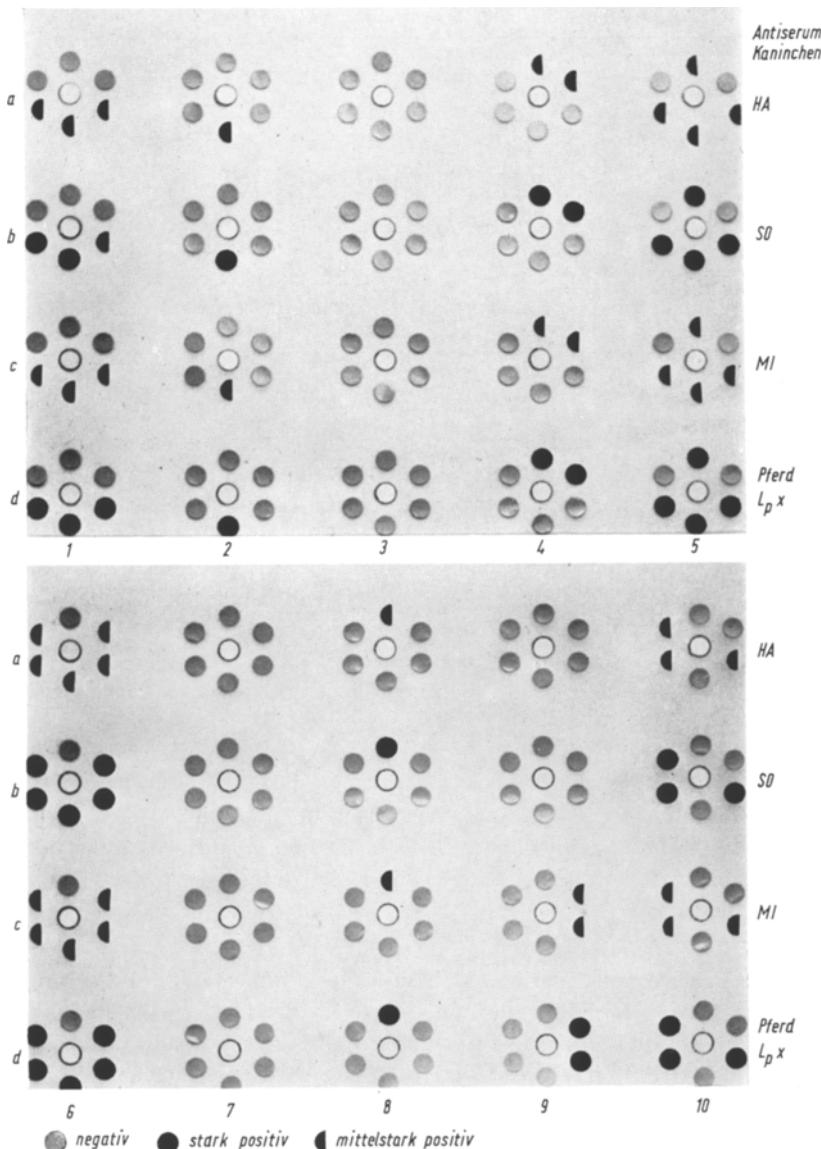


Abb. 2. Lp-Bestimmung. Anordnung wie Abb. 1. Lp(a)-Kaninchenserum nach Absorption konzentriert: Keine schwachen Präcipitationen mehr, in Abb. 1 und 2 sind 120 Serumproben schematisch wiedergegeben

richtet. Die Differenzbreite zwischen 0,8074 (Berlin) und 0,8497 (Heidelberg) für Lp⁻ wird durch weitere Untersuchungen aufzuklären sein.

Tabelle 3. Lp^a -Genfrequenzen von 2078 Proben

Autor	Ort	N	Genfrequenzen			
			$Lp(a+)$	$Lp(a^-)$	Lp^a	Lp^-
BERG	Oslo	314	107	207	0,1877	0,8123
BERG u. WENDT	Marburg	301	98	203	0,1788	0,8212
BUNDSCSUH	Berlin	135	47	88	0,1926	0,8074
BERG, KAHLICH-KOENNER, WEIPPL	Wien	310	97	213	0,1708	0,8292
KLEIN, SCHUHMACHER, GÜNTHER	Heidelberg	1018	346	672	0,1503	0,8497

Zusammenfassung

1. Es wird über Erfahrungen bei der Bestimmung der Serumgruppe Lp berichtet: a) Die vergleichende Bestimmung mit drei verschiedenen $Lp(a)$ - und einem $Lp(x)$ -Antiserum zeigt beträchtliche Schwankungen im Stärkegrad der positiven Reaktionen; b) durch Konzentration des Antiserums nach der spezifischen Absorption können diese Schwankungen weitgehend ausgeglichen, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden; c) der Typus $Lp(a+)$ ist sicherer bestimmbar bei gleichzeitiger Anwendung von mindestens drei verschiedenen $Lp(a)$ -Antiseren.

2. Die Genfrequenz für Lp^a beträgt für die untersuchten 1018 Proben: $Lp^a = 0,1503$.

3. Das als $Lp(x)$ bezeichnete Serummerkmal erscheint häufiger als $Lp(a)$: a) Die Frequenz für das — vollständig hypothetische — Gen Lp^x wäre 0,1876; b) unter 346 Lp -positiven Reaktionen waren 283 $Lp(a+x+)$, 63 $Lp(a-x+)$; c) vergleichbare Differenzen sind in einer größeren Stichprobe auch zwischen verschiedenen $Lp(a)$ -Antiseren zu erwarten.

Résumé

1. On réfère des expériences au sujet de la détermination du groupe de sérum Lp : a) La détermination comparée avec trois antisérum différents $Lp(a)$ et un antisérum $Lp(x)$ montre des fluctuations considérables dans le degré d'intensité des réactions positives; b) par concentration de l'antisérum après l'absorption spécifique ces fluctuations peuvent être équilibrées amplement, mais ne peuvent être annulées complètement; c) le type $Lp(a+)$ est déterminable de façon plus sûre par application simultanée d'au moins de 3 antisérum $Lp(a)$ différents.

2. La fréquence de gènes pour Lp^a comporte pour 1018 épreuves examinées: $Lp^a 0,1503$.

3. Le caractère de sérum désigné comme $Lp(x)$ apparaît plus fréquemment comme $Lp(a)$: a) La fréquence pour le gène Lp^x — complètement hypothétique — serait 0,1876; b) parmi 346 réactions Lp -positives ran-

geaiient 283 Lp(a+x+), 63 Lp(a-x+); c) des différences comparables sont à attendre également des antisérum Lp(a) différents lors d'un contrôle plus large.

Literatur

- BAITSCH, H., u. K. G. LIEBREICH: Die Haptoglobintypen, Allelenhäufigkeit in einigen Stichproben. *Blut* **7**, 69—96 (1961).
- BERG, K.: A new serum type system in man — the Lp system. *Acta path. microbiol. scand.* **59**, 369—382 (1963).
- Comparative studies on the Lp and Ag serum type system of humanlipoprotein. *Xth Congr. Internat. Soc. Blood Transf.*, Stockholm 1964, PSP: 2.
- Precipitation reactions in agar gel between normal human sera. *Vox Sang.* (Basel) **10**, 222—224 (1965).
- D. M. KAHLICH-KOENNER u. G. WEIPPL: Untersuchungen über das Lp-System. Häufigkeit und Antiserenvergleich. *Humangenetik* **1**, 319—321 (1965).
- , u. J. MOHR: Genetics of the Lp system. *Acta genet. (Basel)* **13**, 349—360 (1963).
- , u. G. G. WENDT: Das Lp-System. Herstellung des Antiserums, Testmethode, Ergebnisse. *Humangenetik* **1**, 24—30 (1964).
- BUNDSCUH, G.: Persönliche Mitteilung 1965.
- , u. A. VOGT: Die Häufigkeit des Merkmals Lp(x) in der Berliner Bevölkerung. *Humangenetik* **1**, 379—382 (1965).
- CROWLE, A. J.: Immundiffusion. New York and London: Academic Press 1961.
- HEISKELL, C. L., R. T. FISK, W. H. FLORSHEIM, A. TACHI, J. R. GOODMAN, and C. M. CARPENTER: A simple method for quantitation of serum β -lipoproteins. *Amer. J. clin. Path.* **35**, 222 (1961).
- HJERTÉN, S.: Calcium phosphate chromatography of normal human serum and of electrophoretically isolated serum proteins. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **31**, 216—235 (1959).
- JÖRGENSEN, G., H. DENGLER u. U. HOPFER: Untersuchungen des β -Lipoprotein-systems nach BERG bei Gesunden, Kranken und Schwangeren. *Humangenetik* **1**, 476—478 (1965).
- KAHLICH-KOENNER u. G. WEIPPL: Lp-Typsensystem und β -Lipoprotein-Konzentration. *Humangenetik* **1**, 388—389 (1965).
- MOHR, J., and K. BERG: Genetics of the Lp serum types: Associations and linkage relations. *Acta genet. (Basel)* **13**, 343—348 (1963).
- OUCHTERLONY, O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* **5**, 1—78 (1958).
- PROKOP, O., u. G. BUNDSCUH: Anti-Lp(a) vom Pferd. *Z. klin. Chem.* **2**, 193 (1964).
- RENNIGER, W.: Das Lp-System, ein neuer erblicher Polymorphismus im menschlichen Serum. *Dtsch. med. Wschr.* **47**, 2249 (1964).
- ROSENKRANZ, Q., u. G. WEIPPL: β -Lipoprotein im Kindesalter. *Wien. klin. Wschr.* **76**, 24 (1964).
- SPEISER, P.: Diskussion zu WEIPPL u. KAHLICH-KOENNER, Gesellschaft Ärzte Wien. *Münch. med. Wschr.* **1965**, 1456.
- TISELIUS, A., S. HJERTÉN, and O. LEVIN: Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem.* **65**, 132—155 (1956).
- WEIPPL, G., u. D. M. KAHLICH-KOENNER: Derzeitige Kenntnis des neuen Serum-typsensystems Lp (Gesellschaft Ärzte Wien. Vortrag) *Münch. med. Wschr.* **1965**, 1456.

Prof. Dr. H. KLEIN
Abteilung Verkehrsmedizin
im Institut für gerichtliche Medizin der Universität
69 Heidelberg, Voßstr. 2