

Isoelektrische Fokussierung und anschließende immunochemische Charakterisierung der Lipoproteine des Humanserums

Von

G. Kostner, A. Depisch, W. Albert und A. Holasek*

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie der Universität Graz,
A-8010 Graz, Austria

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 20. März 1972)

Isoelectric Focusing and Subsequent Immunochemical Characterization of the Lipoproteins of Human Serum

Analytical isoelectric focusing, one of the most sensitive methods, separates lipoproteins of human serum into eight different fractions. According to the lipoprotein "family concept" each lipoprotein differing from another by the protein part, represents a separate family or class. Applying different immunochemical methods using antisera monospecific to lipoproteins or their constitutive peptides, we demonstrated the difference in the protein structure of most of those bands. Thus most of the fractions isolated by isoelectric focusing could be related to already known lipoprotein families. In addition, some unknown lipoproteins were discovered.

Mit Hilfe der analytischen isoelektrischen Fokussierung, einer der zur Zeit empfindlichsten Analysemethoden, gelingt es, die Lipoproteine des Humanserums in mindestens acht Fraktionen aufzutrennen. Nach dem Lipoprotein-, Familienkonzept¹ repräsentiert jede Fraktion, die sich von einer anderen in ihrem Proteinanteil unterscheidet, eine andere Familie oder Klasse. Mit Hilfe verschiedener immunochemischer Techniken unter Verwendung monospezifischer Antisera gegen einzelne Lipoproteinfamilien beziehungsweise gegen Polypeptide, aus denen diese aufgebaut sind, gelang es nachzuweisen, daß sich die meisten Banden in ihrem Proteinanteil unterscheiden. Damit konnte ein Großteil der fokussierten Fraktionen den bereits bekannten Lipoproteinfamilien zugeordnet werden; zum Teil konnten noch unbekannte Lipoproteine entdeckt werden.

* Herrn Prof. Dr. O. Kratky, Vorstand des Institutes für physikalische Chemie der Universität Graz, zum 70. Geburtstag mit herzlichen Glückwünschen gewidmet.

Einleitung

Die Lipoproteine des Humanserums stellen ein Gemisch von Partikeln dar, die aus Lipid und Protein in wechselndem Mengenverhältnis aufgebaut sind. Nach der elektrophoretischen Wanderung teilt man sie in α -, β - und Prä- β -Lipoproteine und nach ihrer hydratisierten Dichte in Chylomikronen, Very Low Density Lipoproteine (*VLDL*), Low Density Lipoproteine (*LDL*) und High Density Lipoproteine (*HDL*) ein¹. Innerhalb dieser Gruppen besteht nicht nur eine Heterogenität in bezug auf Partikelgröße und Lipidzusammensetzung, sondern auch im Aufbau des Proteinanteils².

Auf Grund dieser Proteine, der Apolipoproteine (*ApoLp*), lassen sich Lipoproteine in Familien einteilen. Bis heute kennt man drei Lipoproteinfamilien: *LpA*, *LpB* und *LpC*. Ursprünglich vertrat man die Ansicht, daß es nur zwei *ApoLp* gibt, nämlich das durch Entfetten der α -Lipoproteine gewonnene *ApoLpA* und das aus den β -Lipoproteinen gewonnene *ApoLpB*. 1964 fanden *Gustafson* und Mitarb.³ ein weiteres *ApoLp*, das *ApoLpC*, welches einen beträchtlichen Teil des Eiweißanteiles der *VLDL* (Prä- β -Lipoproteine) und der Chylomikronen ausmacht.

Mit verfeinerten analytischen und präparativen Methoden gelang der Nachweis, daß das *ApoLpA* aus zwei und das *ApoLpC* aus mindestens drei nichtidentischen Polypeptidketten aufgebaut ist. Zunächst isolierten *Shore* und *Shore*⁴ zwei Polypeptide aus *HDL*, welche nach den von ihnen gefundenen C-terminalen Aminosäuren R-Thr und R-Gln genannt wurden. Spätere Untersuchungen zeigten, daß beide Polypeptide Gln als C-terminale Aminosäure besitzen, weswegen es zweckmäßiger ist, die Peptide als *ApoAI* und *ApoAII* zu bezeichnen⁵. *ApoAI* hat Asparaginsäure als N-terminale Aminosäure; die N-terminale Aminosäure von *ApoAII* ist blockiert und bis heute noch nicht identifiziert worden.

Ob das *ApoLpB* nur aus einer Art von Polypeptiden aufgebaut ist, konnte noch nicht mit Sicherheit geklärt werden. Sieht man vom genetisch bedingten Polymorphismus ab^{6, 7}, so ist es zwar gelungen, nach der Entfettung von *LDL* in der Gelfiltration zwei Proteinfractionen mit unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung zu gewinnen⁸; bedenkt man jedoch, daß selbst ein *LDL*, welches aus einem sehr engen Dichtebereich isoliert und mehrfach gewaschen wurde, noch immer bis zu 10% *LpA* und *LpC* enthält⁹, scheinen diese Befunde experimentell nicht genügend fundiert zu sein.

Nachdem die Existenz von *LpC* als eine selbständige Lipoproteinfamilie lange Zeit postuliert wurde, gelang es kürzlich, ein Lipoprotein aus der *HDL*-Fraktion zu isolieren, das frei von *LpA* und *LpB* war und auf Grund seiner immunochemischen Reaktion, seines Peptidgehaltes

und seiner hydratisierten Dichte einwandfrei als *LpC* charakterisiert wurde^{10, 11}. Aus *LpC* konnten drei nichtidentische Polypeptide isoliert werden¹², die, ebenfalls nach ihren C-terminalen Aminosäuren, als R-Val, R-Glu und R-Ala₁ bzw. R-Ala₂ bezeichnet wurden. Da auch hier eine Korrektur der vermeintlichen C-terminalen Aminosäuren notwendig war¹³ (R-Val besitzt Ser. als C-terminal), erscheint es zweckmäßiger, die Polypeptide als *ApoCI*, *ApoCII*, *ApoCIII*₁ bzw. *ApoCIII*₂ zu bezeichnen¹⁴.

Untersucht man entfettete Lipoproteine bestimmter Dichte mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (*PAGE*) und immunochemischer Methoden, zeigt es sich, daß in allen Dichtefractionen die Peptide aller drei Lipoproteinfamilien vorhanden sind. Andererseits findet man Banden, welche keinem der bekannten Polypeptide zugeordnet werden können. Welcher Lipoproteinfamilie diese Peptide angehören, ist noch völlig unbekannt.

Eine Trennung der intakten Lipoproteine gelingt mit der Papierlektrophorese in zwei, mit der Agarosegelelektrophorese und der *PAGE* in vier Banden. Durch präparative Trennung der Lipoproteine in der Ultrazentrifuge erhält man 4 Hauptfraktionen. Ob elektrophoretisch oder in der Ultrazentrifuge gewonnen, stellt jede dieser Fraktionen immer noch ein Gemisch verschiedener Lipoproteine dar. Man war daher bestrebt, Methoden zu finden, die möglichst alle im Blutserum vorhandenen Lipoproteinfamilien und deren Untereinheiten (Klassen) zu trennen vermögen. Im Jahre 1969 gelang es in unserem Laboratorium, die Serumlipoproteine mit Hilfe der analytischen isoelektrischen Fokussierung (*IEF*) in 8 Haupt- und einige Nebenfraktionen aufzutrennen¹⁵. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, lassen sich die meisten in der *IEF* getrennten Banden mit Hilfe mono- und paucispezifischer Antisera den schon bekannten Lipoproteinen zuordnen. Zum Teil wurden jedoch auch noch unbekannte Familien und Klassen entdeckt.

Material und Methoden

Sera, die zur Fokussierung eingesetzt wurden, stammten von 20- bis 40jährigen Probanden beiderlei Geschlechts nach mindestens 14stdg. Fasten. In der Agarosegelelektrophorese zeigten alle Seren ein normales Lipoproteinmuster, und auch die Blutlipidwerte lagen innerhalb der Norm für das entsprechende Alter und Geschlecht.

Die Bereitung der Gele, Vorfärbung der Seren sowie praktische Ausföhrung der *IEF* erfolgte nach *Kostner* und Mitarb.¹⁵. Die Bereitung der photopolymerisierten Gele geschah durch Mischen von 0,5 g Acrylamid, 0,02 g Bis-acrylamino-methan, 0,1 mg Riboflavin in 5 µl TEMED, 0,5 ml 40proz. Ampholine 3—10, 3,3 ml Äthylenglycol ad 10 ml (dest. Wasser). 10—40 µl vorgefärbtes Humanserum wurden pro Röhrchen fokussiert, abhängig davon, ob eine starke oder schwache Bande untersucht werden

sollte. Die Laufzeit betrug bei einer Spannung von 200 V 10—14 Stdn. bei 4 °C.

Immunoelektrophoresen sowie Immunodiffusionen wurden in 1proz. Agarose (Bio. Rad) in Barbitalpuffer vom pH-Wert 8,2 bei einer Ionenstärke von 0,5 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Betrachten der gebildeten Präzipitationslinien in diffusem Licht. Manche Gele wurden nach 36stdg. Waschen in 0,15M-NaCl (pH 7,5) getrocknet und auf Protein mit Amidoschwarz 10B und auf Lipid mit Sudanschwarz gefärbt. Zur Identifizierung der während der Fokussierung gebildeten Banden wurden diese mit einer Rasierklinge horizontal aus den Gelen geschnitten und direkt in Agarose vergossen oder mit 0,1M-NaCl vom pH-Wert 7,5 eluiert. Bisweilen wurden auch ganze Gele vertikal in zwei Hälften geteilt, auf Objektträger aufgebracht, mit Agarosegel vergossen und in Abständen von 3—8 mm ein Antiserumtrog ausgehoben, der über die ganze Länge der Gele reichte. Bei Vorhandensein genügender Mengen Antiserum wurden die Gele in einem Reagensglas mit 1—5 ml Antiserum für 48 Stdn. bei Zimmertemp. geschaukelt; der gebildete Präzipitationsring wurde in diffusem Licht betrachtet.

Die Antiseren wurden durch Immunisierung von Kaninchen, Schafen und Pferden mit reinen Lipoproteinfraktionen bzw. den daraus isolierten Polypeptiden hergestellt. Die genaue Durchführung der Präparierung dieser Fraktionen wurde früher beschrieben^{5, 10, 16}. Folgende Antiseren kamen zur Verwendung: Anti*ApoAI*, monospezifisch (Schaf); Anti*ApoAII*, monospezifisch (Schaf); Anti*HDL*_{ads.}: Dieses Antiserum wurde durch Adsorption von Anti*HDL* mit reinen *ApoAI*- und *ApoAII*-Polypeptiden hergestellt und war monospezifisch für ein noch nicht charakterisiertes Polypeptid der *LpA*-Familie (Kaninchen); Anti*LpC* reagierte mit allen 3 *ApoLpC*-Peptiden (Schaf); Anti*LpB*, monospezifisch (Pferd, Schaf, Kaninchen).

Zur Abtrennung bzw. Isolierung von Lipoproteinfraktionen wurde die Dichte des Serums mit festem NaBr aufeinanderfolgend auf die Werte 1,006 (*VLDL*), 1,063 (*LDL*), 1,125 (*HDL*₂) und 1,210 (*HDL*₃) gebracht und für 22—40 Stdn. in der präparativen Ultrazentrifuge (Beckman L4) zentrifugiert. Die flotierenden sowie sedimentierenden Bestandteile wurden gegen isotope Kochsalzlösung dialysiert. Zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte der durch die Fokussierung getrennten Lipoproteinfraktionen wurden die gefärbten Banden von mehreren Gelen herausgeschnitten, 24 Stdn. mit bidest. Wasser gerührt und der pH-Wert mittels einer Einstab-Mikroelektrode gemessen.

Zur Entfernung der Lipoproteine niederer Dichte (*VLDL* plus *LDL*) aus dem Serum wurden Fällungen mit Dextransulfat 500 nach *Cornwell* und *Kruger*¹⁷ und mit Na-Phosphorwolframat nach *Burstein* und *Morfin*¹⁸ durchgeführt. Der Niederschlag sowie der Überstand wurden gegen 0,15M-NaCl dialysiert und fokussiert.

Resultate

Abb. 1 zeigt das Lipoproteinmuster von Humanserum nach isoelektrischer Fokussierung unter Verwendung von Ampholine 3—10. Die strichliert eingezeichneten Banden sind nicht mit jedem Serum darstellbar und wurden bei der immunochemischen Auswertung nicht berück-

sichtlich. In Tab. 1 sind die isoelektrischen Punkte der einzelnen Banden zusammengestellt. Die Numerierung stimmt mit der in Abb. 1 überein.

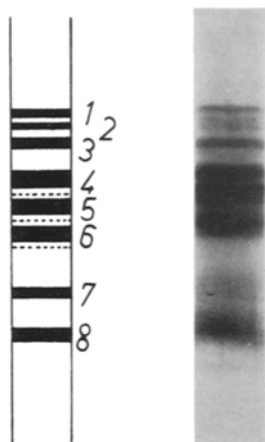


Abb. 1. Isoelektrische Fokussierung von Humanserum in Polyacrylamidgel unter Verwendung von Ampholine 3—10

Tabelle 1. Isoelektrische Punkte der durch Fokussierung gewonnenen Lipoproteinfraktionen

Lipoproteinbande in Abbildung 1	Isoelektrischer Punkt
1	4,4
2	4,5
3	4,6
4	4,8
5	5,0
6	5,1
7	5,5
8	5,7

Immunochemische Untersuchungen

Abb. 2 zeigt die immunochemische Reaktion der durch Fokussierung getrennten Lipoproteinbanden im Ouchterlony-Test unter Verwendung verschiedener Antisera. Es reagieren die Bande 1 und 2 mit Antiserum gegen *LpC*, Bande 4 mit Antiserum gegen *ApoAI* und *HDL_{ads.}*, Bande 5 mit Antiserum gegen *ApoAI* und *ApoAII*, Bande 6 mit Antiserum gegen *ApoAI*, und Bande 7 und 8 mit Antiserum gegen *LpB*. Bande 3 reagierte mit keinem Antiserum gegen bisher bekannte Apolipoproteine. Wenn die Gele der Länge nach in Agarosegel eingebettet wurden und Antisera

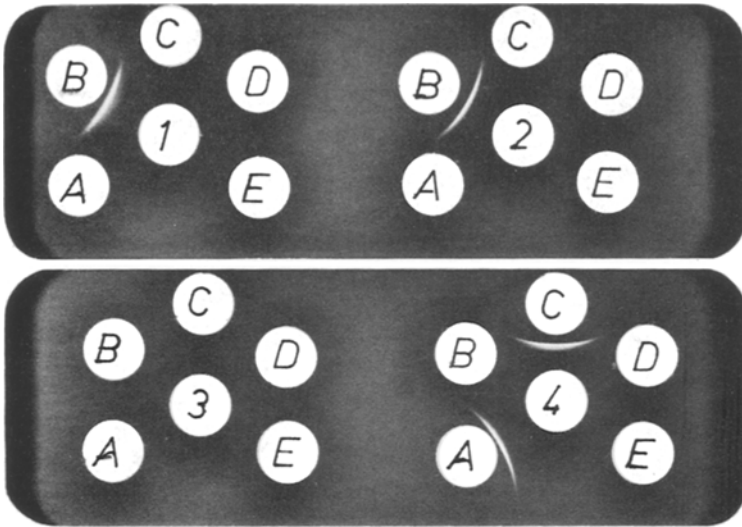


Abb. 2 a

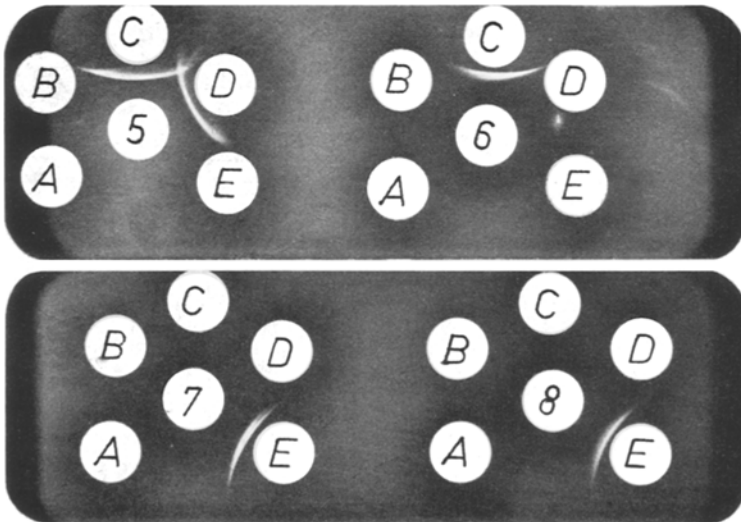


Abb. 2 b

Abb. 2. Immunochemische Reaktion der durch *IEF* gewonnenen Lipoproteinfraktionen im Ouchterlony-Test. Die Zahlen 1—8 repräsentieren die Bandennummern in Abb. 1. A: Antiserum gegen *HDL* (adsorbiert). B: Antiserum gegen *LpC*. C: Antiserum gegen *ApoAI*. D: Antiserum gegen *ApoAII*. E: Antiserum gegen *LpB*.

dagegen diffundierten, zeigten sich an den entsprechenden Stellen charakteristische Präzipitationslinien. Da beim Vorhandensein von Polyacrylamidgelen in Agarosegel die Gele während des Trocknens zerrißen, war ein nachträgliches Färben und Photographieren nicht mehr

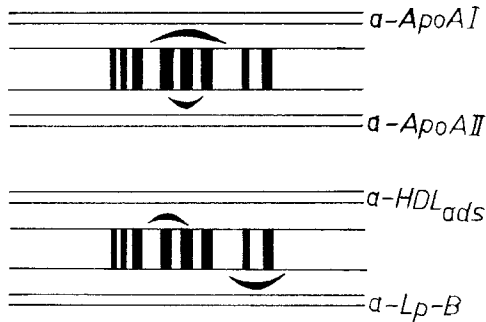


Abb. 3. Immunochemische Reaktion kompletter Gele nach *IEF* von Humanserum unter Verwendung verschiedener Antisera

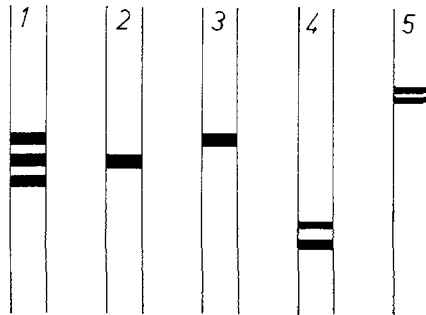


Abb. 4. Gebildete Präzipitate in Polyacrylamidgel nach Fokussierung von Humanserum und Eintauchen in die Antisera: 1: Anti-*ApoAI*. 2: Anti-*ApoAII*. 3: Anti-*HDL_{ads}*. 4: Anti-*LpB*. 5: Anti-*LpC*

möglich. Die gesehenen Präzipitationen sind daher graphisch in Abb. 3 dargestellt. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse wurde auch gefunden, wenn die Gele in die verschiedenen Antisera getaucht wurden (Abb. 4).

Um feststellen zu können, welche Lipoproteinfraktionen durch Dextransulfat bzw. Na-Phosphorwolframat fällbar sind, ob die Fällungen quantitativ verlaufen und inwieweit sie mit der Fraktionierung in der Ultrazentrifuge übereinstimmen, wurden die Niederschläge und Überstände der *IEF* unterworfen und mit Lipoproteinen verschiedener Dichte verglichen. Die Ergebnisse sind aus Abb. 5 zu entnehmen. Wie daraus

ersichtlich, fällt Dextransulfat alle Lipoproteine mit einer geringeren Dichte als 1,063 und einen Teil der *HDL*. Mit Phosphorwolframsäure werden nur *VLDL* plus *LDL* gefällt, während alle *HDL* im Überstand verbleiben.

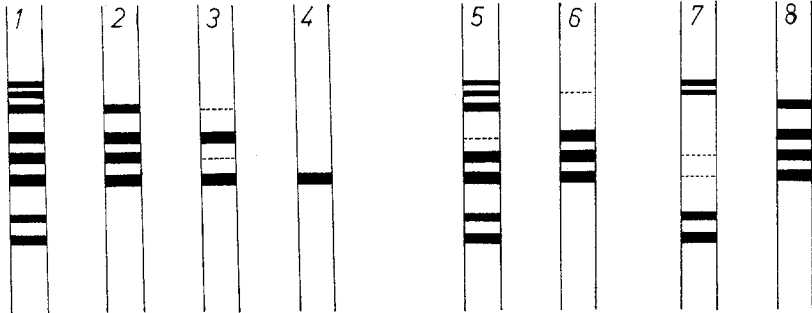


Abb. 5. Lipoproteinstreifenmuster des Humanserums und verschiedener Fraktionen, die in der präparativen Ultrazentrifuge und durch fraktionierte Fällungen gewonnen wurden: 1: Humanserum komplett. 2: Sedimentierende Lipoproteine bei einer Dichte von 1,063. 3: Sedimentierende Lipoproteine bei einer Dichte von 1,125. 4: Sedimentierende Lipoproteine bei einer Dichte von 1,21. 5: Lipoproteine im Niederschlag der Dextransulfatfällung. 6: Lipoproteine im Überstand der Dextransulfatfällung. 7: Lipoproteine im Niederschlag der Phosphorwolframsäurefällung. 8: Lipoproteine im Überstand der Phosphorwolframsäurefällung

Diskussion

Wie bereits einleitend erwähnt, konnten in jüngster Zeit aus Lipoproteinfraktionen mindestens 7—8 Polypeptide isoliert werden, die sich sowohl immunochemisch als auch in ihrer Aminosäurezusammensetzung voneinander unterscheiden. Die Apolipoproteine, aus denen die reinen Polypeptide isoliert wurden, gewannen man durch Entfetten von Lipoproteinen, die ihrerseits Gemische von Lipoproteinfamilien darstellen. Es war demnach nachträglich nicht mehr möglich festzustellen, welche Peptide am Aufbau der verschiedenen Familien beteiligt sind und ob es Klassen von Lipoproteinfamilien gibt. Aus vereinzelt Experimenten war nur bekannt, daß es *HDL*-Fraktionen gibt, die ausschließlich *ApoAI* und solche, die *ApoAI*- und *ApoAIII*-Polypeptide enthalten^{10, 19}. Dieser Unterschied erklärt auch das Auftreten der beiden α -Lipoproteine in der Agarosegelelektrophorese¹⁵.

Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ersichtlich, können mit Hilfe der *IEF* im Humanserum 3 Unterfamilien (Klassen) des *LpA* getrennt und anschließend immunochemisch nachgewiesen werden:

Die eine Klasse besitzt nur *ApoAI*, die zweite *ApoAI* und *ApoAIII*

und die dritte *ApoAI* und ein Polypeptid, das bis heute noch nicht in reiner Form isoliert oder nach seiner Aminosäurezusammensetzung charakterisiert werden konnte. Nach der heute üblichen Nomenklatur könnte man dieses Peptid *ApoAIII* nennen.

Durch *IEF* des Humanserums konnten zwei Banden gefunden werden, die mit Antiserum gegen *LpB* reagieren (Bande 7 und 8 in Abb. 1). Diese *LpB*-Banden sind jedoch im Verhältnis zur *LpB*-Konzentration im Serum etwas schwach ausgeprägt und außerdem sind sie nicht so scharf wie die *LpA*-Banden. Wegen der Instabilität von *LpB* — vor allem im pH-Bereich seines isoelektrischen Punktes — kann aus diesen Versuchen daher nicht mit Sicherheit geschlossen werden, daß es sich tatsächlich um zwei verschiedene *LpB*-Klassen handelt. Auch war es mit keinem der uns zur Verfügung stehenden Antiseren möglich, mit diesen beiden Banden sich kreuzende Präzipitationslinien im Ouchterlony-Test zu erhalten. Im Hinblick auf die in der Literatur beschriebenen Polymorphismen des *LpB* kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den differenzierbaren *LpB*-Banden um Allotypen handelt. Diese Frage könnte durch Anwendung monospezifischer Antiseren gegen die Antigene des *Lp(a)*- bzw. *A_g*-Systems beantwortet werden.

Das Vorkommen von *LpC* als eigene Lipoproteinfamilie wurde nach Auffinden von *LpX* im Serum von Patienten mit Cholestase (obstruktiver Gelbsucht) bereits vermutet²⁰ und konnte durch die Isolierung eines Lipoproteins aus der *HDL*-Fraktion des Humanserums, das nur mit Antikörpern gegen *LpC* reagierte^{10, 11}, bekräftigt werden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Ergebnisse und weisen überdies darauf hin, daß die *LpC*-Familie in zwei Klassen zerfällt. Wie bereits erwähnt, ist das *LpC* aus drei nicht-identischen Polypeptiden aufgebaut. Da keine monospezifischen Antiseren gegen diese einzelnen Peptide zur Verfügung standen, konnte nicht geklärt werden, welcher der beiden *LpC*-Klassen sie angehören.

Neben den multiplen Formen der *LpA*-, *LpB*- und *LpC*-Familien können mit Hilfe der *IEF* noch Banden gefunden werden, die keinen der bisher bekannten Lipoproteinfamilien zugeordnet werden können. Es sind dies Bande 3 und die in Abb. 1 strichliert dargestellten Banden. Dabei handelt es sich offenbar um Lipoproteinfamilien, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurden.

Die *IEF* stellt derzeit die empfindlichste Methode dar, um die Vielzahl der Lipoproteinfamilien und -klassen analytisch zu erfassen. Eine befriedigende präparative Isolierung von Lipoproteinen mit dieser Methode scheiterte daran, daß pro Lauf in der LKB-440-Apparatur nur etwa 5 ml Serum aufgetragen werden können, man also eine Vielzahl von präparativen Läufen benötigt, um ausreichende Mengen dieses Materials zu erhalten. Da die so gewonnenen Lipoproteinfraktionen

nicht frei von anderen Serumproteinen sind, müßten weitere Reinigungsschritte angeschlossen werden.

Wie die *IEF* zeigt, werden sowohl durch Dextransulfat als auch durch Na-Phosphorwolframat die gesamten *LDL* und *VLDL* gefällt, wobei Dextransulfat auch einen Teil der *HDL* mitfällt. Die hier beschriebenen, noch unaufgeklärten beiden Lipoproteine verbleiben im Überstand. Sie sedimentieren mit den übrigen *HDL* bei der Dichte von 1,063 und flotieren bei $d = 1,21$. Auf diese Art gelingt es demnach nicht, eine größere Menge dieser Lipoproteine zu gewinnen und näher zu untersuchen.

Bekanntlich spielen der Gehalt und das Mengenverhältnis der einzelnen Lipoproteinfamilien im Serum eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen. Mit der heute üblichen Methode der Lipoproteinelektrophorese in Agarosegel gelingt es lediglich, 3—4 Lipoproteinfraktionen zu erfassen. Die Elektrofokussierung stellt vielleicht einen aussichtsreichen Weg zur erweiterten Diagnose verschiedener pathologischer Veränderungen der Serumlipoproteine dar.

Literatur

- ¹ O. F. DeLalla und J. W. Gofman, *Methods Biochem. Anal.* **1**, 459 (1954).
- ² P. Alaupovic, *Atherosclerosis* **13**, 141 (1971).
- ³ A. Gustafson, P. Alaupovic und R. H. Furman, *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 767 (1964).
- ⁴ B. Shore und V. Shore, *Biochem.* **7**, 2773 (1968).
- ⁵ G. Kostner und P. Alaupovic, *FEBS Letters* **15**, 320 (1971).
- ⁶ A. C. Allison und B. S. Blumberg, *The Lancet* **I**, 634 (1961).
- ⁷ K. Berg, *Vox Sanguinis* **12**, 71 (1967).
- ⁸ J. P. Kane, E. G. Richards und R. J. Havel, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **66**, 1075 (1970).
- ⁹ D. M. Lee, *Abstr. XIX Ann. Coll. on Protides of Biol. Fluids*, Brugge, April 1971.
- ¹⁰ G. Kostner und P. Alaupovic, *Abstr. XIX Ann. Coll. on Protides of Biol. Fluids*, Brugge, April 1971.
- ¹¹ G. Kostner und P. Alaupovic, *Biochem.* **11**, 3419 (1972).
- ¹² W. V. Brown, R. I. Levy und D. S. Fredrickson, *J. Biol. Chem.* **245**, 6588 (1970).
- ¹³ P. Herbert, R. I. Levy und D. S. Fredrickson, *J. Biol. Chem.* **246**, 7068 (1971).
- ¹⁴ W. McConnathy, C. Quiroga und P. Alaupovic, *FEBS Letters* **19**, 323 (1972).
- ¹⁵ G. Kostner, W. Albert und A. Holasek, *Z. Physiol. Chem.* **350**, 1347 (1969).
- ¹⁶ G. Kostner und A. Holasek, *Biochem.* **11**, 1217 (1972).
- ¹⁷ D. G. Cornwell und F. A. Kruger, *J. Lipid Res.* **2**, 110 (1961).
- ¹⁸ M. Burstein und R. Morfin, *Life Science* **8**, 345 (1969).
- ¹⁹ J. J. Albers und F. Aladjem, *Biochem.* **10**, 3436 (1971).
- ²⁰ D. Seidel, P. Alaupovic und R. H. Furman, *J. Clin. Invest.* **48**, 1211 (1969).