Isolierung von β_1 A/C-Globulin aus menschlichem Serum mittels Hydroxylapatit- und DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie

Von D. ROELCKE

Aus dem Serologischen Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. E. Krah)

(Eingegangen am 12. April 1967)

Ein neues Verfahren zur Darstellung von β_1 A/C-Globulin wird mitgeteilt. Die Reinigung des Proteins aus unvorbehandeltem Serum erfolgt an Hydroxylapatit-Säulen. γ G-Globulin-Kontaminationen und Spuren anderer Proteine können durch anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher vollständig entfernt werden. Der hohe Reinheitsgrad derart isolierten β_1 A/C-Globulins wird in Immunisierungsversuchen erwiesen, bei denen monovalente Antiseren gegen β_1 A/C-Globulin erzielt wurden.

A new method is reported for the preparation of β_1 A-globulin. The protein is purified from untreated serum on columns of hydroxylapatite. γ G-globulin and traces of other proteins are then completely removed by ion exchange chromatography on DEAE cellulose. The high purity of β_1 A-globulin isolated in this way was shown by the production of monovalent antisera to β_1 A-globulin in immunisation experiments.

Seit der ersten Darstellung des β_1 A-Globulins und dem Nachweis der Beziehungen seiner nativen β_1 C-Variante zu C_3' des Komplementsystems durch MÜLLER-EBERHARDT (1, 2) erscheint die Entwicklung von Methoden wünschenswert, die neben β_1 C auch weitere inzwischen bekannte β_1 A-Varianten in möglichst kurzer Zeit unter schonenden Bedingungen zu isolieren erlauben. Ein den bis jetzt beschriebenen Methoden an *zeitlicher Kürze* überlegenes Verfahren der β_1 A-Darstellung wird in dieser Arbeit mitgeteilt. Durch einmalige Chromatographie an Hydroxylapatit wird innerhalb von 6—8 Stdn. eine β_1 A-Präparation oder eine Präparation von Varianten des Globulins erzielt, die bei immunoelektrophoretischer Prüfung noch mit γ G-Globulin-Resten verunreinigt sind; daneben finden sich gelegentlich Spuren eines kontaminierenden α_2 - und/oder α_1 -Globulins. Hochgereinigte β_1 A-Präparationen können durch zusätzliche Chromatographie an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher zur Darstellung gebracht werden. Die dabei gewonnenen Präparationen sind spezifisch, nur gelegentlich werden noch bei Prüfung in der Mikro-Ouchterlony-Technik äußerst geringe Spuren von γ G-Globulin angetroffen.

Material und Methoden

Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir aktive und inaktivierte undialysierte Seren oder Serumgemische verschiedener β_1 A-Alterationen.

Säulenmatrix

Hydroxylapatit stellten wir nach den Angaben von TISELIUS, HJERTÉN und LEVIN (3) her.

DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher, Kapazität 0,73 mval/g bezogen wir vom Serva-Entwicklungslabor Heidelberg.

Eluens

Phosphatpuffer pH 6,8 folgender Molaritäten: 0,02M, 0,03M; 0,07M; 0,10M; 0,12M; 0,18M; 0,20M; 0,25M; 0,65M wurden durch Mischen gleichmolarer Na_2HPO_4 - und KH_2PO_4 -Lösungen erhalten.

Säulen

Die Abmessungen der verwendeten Säulen waren 1,3 cm $\times$ 30 cm und 2,1 cm $\times$ 30 cm, die Hydroxylapatitschichthöhe betrug jeweils 12 cm. Serumbeladung mit 8 ml bzw. 20 ml Serum nach Maßgabe der Mengen der jeweils zur Verfügung stehenden Seren oder

Fraktionen. Wesentliche Unterschiede im Trennvermögen beider Säulentypen wurden nicht beobachtet.

Chromatographie

Zwischen Säule und Fraktionssammler RadiRac schalteten wir das UV-Photometer Uvicord (beide Geräte von Fa. LKB, Stockholm). Stufenelution bei Zimmer-Temperatur oder 4°. Fraktionensammlung nach Volumen (3 ml- oder 5 ml-Siphon).

Auswaschen und Einengen

Druckfiltrationsgeräte der Membranfiltergesellschaft Göttingen.

Elutionsmodus der Hydroxylapatitsäulen

Kurzdarstellung

0,03M Phosphatpuffer pH 6,8

0,10M Phosphatpuffer pH 6,8

0,18M Phosphatpuffer pH 6,8

Darstellung im Zusammenhang mit Gc-Globulin-Gewinnung

(ROELCKE und HELMBOLD (4)).

0,03M Phosphatpuffer pH 6,8

0,07M Phosphatpuffer pH 6,8

0,10M Phosphatpuffer pH 6,8

0,18M Phosphatpuffer pH 6,8

Darstellung zur Erzielung hochgereinigter β_1 A-Präparationen

0,18M Eluat (Elutionsmodus Kurzdarstellung): Auswaschen oder Dialyse: 0,02M, einstellen auf $E_{280\text{ nm}} \sim 1,0$, Rechromatographie an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher:

0,02M Phosphatpuffer pH 6,8

0,12M Phosphatpuffer pH 6,8

γ G-Globulin-Desorption

β_1 A-Globulin-Desorption

Darstellung im Zusammenhang mit Coeruloplasmingewinnung

(HJERTÉN (5))

0,03M Phosphatpuffer pH 6,8

0,10M Phosphatpuffer pH 6,8

0,25M Phosphatpuffer pH 6,8

0,25M Eluat: Auswaschen oder Dialyse: 0,02M, einstellen auf $E_{280\text{ nm}} \sim 1,0$, Rechromatographie an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher:

0,02M Phosphatpuffer pH 6,8

0,12M Phosphatpuffer pH 6,8

0,20M Phosphatpuffer pH 6,8

γ G-Globulin-Desorption

β_1 A-Globulin-Desorption

Coeruloplasmin-Desorption

Darstellung im Rahmen der an Hydroxylapatit möglichen Serumauftrennung

0,03M Phosphatpuffer pH 6,8

β_1 A-Globulin-, $\alpha_2(\beta)$ -Lipoprotein-, Coeruloplasmin-, Gc-Globulin-freies, sonst qualitativ komplettes Eluat.

0,07M Phosphatpuffer pH 6,8

Albumin-Desorption (partiell)

0,10M Phosphatpuffer pH 6,8	Gc-Desorption, evtl. Rechromatographie an Hydroxylapatit
0,18M Phosphatpuffer pH 6,8	β_1 A-Desorption, evtl. Rechromatographie an DEAE-Cellulose
0,25M Phosphatpuffer pH 6,8	Coeruloplasmin-Desorption, evtl. Rechromatographie an DEAE-Cellulose
0,65M Phosphatpuffer pH 6,8	$\alpha_2(\beta)$ Lipoprotein-Desorption

Reinheitsprüfung

Wir verwendeten die Immunelektrophorese- und Immundoppeldiffusion-Mikroausrüstung der Fa. LKB, Stockholm. Antiseren: Anti-Coeruloplasmin und Anti- γ G-Globulin bezogen wir von den Behringwerken Marburg, polyvalente und andere monovalente Humanplasma-Protein-Antiseren stammten aus eigener Herstellung.

Ergebnisse

In wiederholten Versuchen mit guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse trotz Verwendung verschiedener Hydroxylapatit-Chargen wurde die Phosphatpuffermolarität ermittelt, die zur β_1 A-Globulin-Desorption führt, nachdem mit Humanserum beschichtete Säulen zuvor mit 0,03M Phosphatpuffer (pH 6,8) eluiert worden waren. Dabei wurde beobachtet, daß die kritische Molarität stets über 0,1 liegt. Deshalb wurde zunächst mit 0,03M und 0,1M Phosphatpuffer in Stufenelution ausgewaschen. Ein solches zweizeitiges Vorgehen erweist sich als zweckmäßig, da das von TISELIUS (3), HJERTÉN (5), TURBA (6) und anderen Autoren erarbeitete Phänomen der Verdrängungserscheinungen bei Adsorbens-Chromatographie stark ins Gewicht fällt: Bei 0,03M Phosphatpuffer (oder geringerer Molarität) kommt es zwar zu einer massiven Desorption aller mit den verfügbaren Humanserum-Antisera nachweisbaren Serumproteine außer β_1 A-Globulin, $\alpha_2(\beta)$ -Lipoprotein, Coeruloplasmin und Gc-Globulin, doch wird bei nachfolgender Elution mit einem höhermolaren, beispielsweise 0,1M Puffer, eine erneute Desorption besonders derjenigen Proteine beobachtet, die mengenmäßig im Serum dominieren, nämlich Albumin, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, Transferrin und γ G-Globulin. $\alpha_2(\beta)$ -Lipoprotein macht hiervon wegen seiner extrem hohen Hydroxylapatit-Affinität eine Ausnahme, es desorbiert erst bei Verwendung des 0,65M Puffers. Aus diesem Grunde ist es denkbar, daß unter gleichen Bedingungen bei Hydroxylapatit-Chromatographie von Seren mit Dys- oder Paraproteinämien unterschiedliche Chromatogramme erzielt werden (z. B. Hyperlipoproteinämien, Hypercoeruloplasminämien bei Graviden).

Als Phosphatpuffermolarität, bei der nach vorangegangener Elution mit 0,03 und 0,1M Phosphatpuffer β_1 A-Globulin gewonnen wurde, wurde 0,18M unter folgenden Gesichtspunkten gewählt: Einerseits ist die Molarität deutlich höher als die für β_1 A kritische Molarität, so daß sie eine komplette β_1 A-Desorption mit $R_F = 1,0$ ohne nennenswertem *tailing* garantiert, andererseits liegt sie niedriger als die kritische Molarität für das nächste, bei Molaritätssteigerung desorbierende Protein, nämlich Coeruloplasmin (Abb. 1).

Das derart gewonnene β_1 A-Präparat zeigt bei immunoelektrophoretischer Prüfung folgenden Reinheitsgrad:

Abb. 1

Chromatogramm der Stufenelution von Vollserum an Hydroxylapatit, die zur β_1 A-Globulin-Darstellung führt. Immunelektrophoretische Prüfung des 0,03M und 0,18M Eluates.

HSKo = Humanserumkontrolle

β_1 A-Globulin in Vollserumstärke, γ G-Globulinkontamination, sichtbar an einem schwachen diffusen Präzipitat in langsamer γ G-Position, andere Verunreinigungen nur gelegentlich als Spuren eines α_2 -Globulins (evtl. Coeruloplasmin oder Gc) und/oder eines Globulins in α_1 -Position. Ist darüber hinaus ein kräftiges langgezogenes α_2 - α_1 -Präzipitat nachweisbar, so handelt es sich hierbei um eine β_1 A-Variante.

Bei mittelschnell filtrierenden Hydroxylapatitchargen (etwa 15–20 ml/h) ist die Darstellung von β_1 A-Globulin mit dem oben beschriebenen Reinheitsgrad in etwa 7 Stdn. abgeschlossen, wenn für das Einsintern des Serums in die Säulen 2 Stdn., für den Elutionsvorgang 5 Stdn. gerechnet werden. Immunelektrophoretische Prüfung der Präparation kann unmittelbar angeschlossen werden (0,18M Phosphatpuffer pH 6,8 bedingt keine Agarveränderungen), so daß die Darstellung und deren Beurteilung innerhalb von 24 Stdn. möglich sind.

Das beschriebene Darstellungsverfahren kann ohne weiteres mit der Methode der Gc-Globulin-Gewinnung an Hydroxylapatit gekoppelt werden. Dem in diesem Verfahren (ROELCKE und HELMBOLD (4)) beschriebenen Elutionsmodus wird inzwischen folgende Pufferreihenfolge unter Anwendung von Stufenelution vorgezogen: 0,03M- 0,07M- 0,1M Phosphatpuffer, pH 6,8, da bei 0,07M Phosphatpuffer regelmäßig ein beträchtlicher Teil des bei 0,03M Phosphatpuffer noch in der Säule verbliebenen Albumins eliminiert wird, ohne daß es zu einer (par-

tiellen) Gc-Desorption kommt. Die dann bei 0,1M Phosphatpuffer gewonnene Gc-Fraktion enthält bei immunoelektrophoretischer Prüfung außer Gc nur noch Albuminreste. Die gegenüber der Originalmethode (4) erhöhte Puffermolarität des Erstelutionspuffers (0,03M statt 0,01M) bedingt offenbar ferner in Verbindung mit der 0,07-Zwischenmolarität eine restlose Eliminierung der außer Albumin in der sogenannten Gc-Rohfraktion anzutreffenden Kontaminationen. Anschließend Stufenelution mit 0,18M Phosphatpuffer, pH 6,8, führt wieder zur Gewinnung einer β_1 A-Präparation mit dem oben beschriebenen Reinheitsgrad.

Um eine restlose Entfernung der Kontaminationen zu erreichen, war eine weitere Reinigung des β_1 A-Globulins vorzunehmen. Da es hierbei um die Entfernung des in der β_1 A-Präparation verbliebenen γ G-Anteils ging, bot sich eine Modifikation des von SOBER und PETERSON (7, 8) angegebenen Verfahrens zur γ G-Globulin-Darstellung an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher an. Um die Löslichkeit des Euglobulins β_1 A nicht zu gefährden, wurden die mittels Kurzdarstellung gewonnenen Fraktionen (nach Einengung bis $E_{280\text{ nm}} \sim 1,0$) gegen 0,02M Phosphatpuffer, pH 6,8, dialysiert oder zuvor mit Wasser auf 0,02M verdünnte Fraktionen auf $E_{280\text{ nm}} \sim 1,0$ eingengt und dann einer Stufenelution an DEAE-Cellulose-Säulen mit folgendem Elutionsmodus unterzogen: 0,02M zur Elution des γ G-Anteils und 0,12M zur Gewinnung hochgereinigten β_1 A-Globulins. Die bei der zweiten Elutionsstufe gewonnenen β_1 A-Fraktionen zeigten in der Immunelektrophorese keinerlei Kontaminationen (Abb. 2).

Auch bestätigt die Bildung monovalenter β_1 A-Antikörper von Kaninchen, welche mit diesen Fraktionen immunisiert worden waren, den hohen Reinheitsgrad dieser Präparationen. Lediglich in einigen dieser Fälle wurden noch äußerst geringe γ G-Globulin-Spuren mit

der Mikro-Ouchterlony-Technik nachgewiesen, bei Titration 0,1proz. β_1 A-Lösungen gegen Anti- γ G (Behring) wurden höhere Titer als 1/1 nicht beobachtet.

Wurden die mit der (aus der Kurzdarstellung gewonnenen) β_1 A-Fraktion beschickten DEAE-Cellulose-Säulen im Anschluß an die Elution mit 0,12M Puffer mit 0,2M Puffer eluiert, um die komplette β_1 A-Desorption sicherzustellen, so erschien kein β_1 A-Globulin mehr im Eluat, doch konnte in einigen Fällen Coeruloplasmin in geringen Mengen darin nachgewiesen werden. Dieser Befund bot Anlaß zu einer Prüfung, ob im Rahmen der Darstellung hochgereinigter β_1 A-Präparationen eine bequeme Reindarstellung von Coeruloplasmin möglich sei. Ausgehend von den Befunden HJERTÉNS (5), der eine α_2 -Fraktion an Hydroxylapatit zur Coeruloplasmingewinnung weiterreignete und ein Schema zur Coeruloplasmindarstellung aus Vollserum an Hydroxylapatit empfiehlt, wurde folgendermaßen verfahren: Die endgültige Elution der mit Seren beschickten Hydroxylapatitsäulen nach vorangegangenen Elutionen mit 0,03M und 0,1M Puffer wurde nicht, wie bei der Kurzdarstellung, mit 0,18M, sondern mit 0,25M Puffer vorgenommen. Dabei erhält man die beschriebene β_1 A-Fraktion der Kurzdarstellung, in der weiterhin Coeruloplasmin komplett enthalten ist. Eine Weiterreinigung erfolgte dann über die beschriebene Rechromatographie an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher in Stufenelution, wie bereits angegeben (0,02M — 0,12M — 0,20M). Da ein erheblicher Affinitätsunterschied zu DEAE-Cellulose zwischen β_1 A-Globulin und Coeruloplasmin besteht, der sich in einer deutlichen Molaritätsspanne zwischen den für die Desorption beider Proteine erforderlichen Ionenkonzentrationen äußert, bestätigte sich der erwartete gute Trennungserfolg. Bei 0,12M Puffer wurde hochgereinigtes β_1 A-Globulin, bei 0,2M Puffer eine Coeruloplasminfraktion gleichen Reinheitsgrades gewonnen.

Schließlich sei noch kurz auf die Möglichkeit der β_1 A-Darstellung im Rahmen der $\alpha_2(\beta)$ -Lipoprotein-Darstellung an Hydroxylapatit hingewiesen (3). Werden die bei der im Zusammenhang mit der gekoppelten β_1 A-Globulin- und Coeruloplasmin-Darstellung besprochenen, bereits mit den Puffern 0,03M — 0,10M — 0,25M eluierten Säulen mit 0,65M Phosphatpuffer, pH 6,8 weitergewaschen, so gewinnt man $\alpha_2(\beta)$ -Lipoprotein von ebenfalls hohem Reinheitsgrad. Ein zusammenfassendes Schema über die besprochenen Möglichkeiten der Reindarstellung von Proteinen an Hydroxylapatit, die sich mit der β_1 A-Globulin-Darstellung ohne großen Aufwand kombinieren lassen, ist unter *Methodik* (Darstellung im Rahmen der an Hydroxylapatit möglichen Serumauftrennung) gegeben.

Diskussion

MÜLLER-EBERHARD gelang als erstem die Darstellung von β_1 A-Globulin aus Serum mittels Euglobulinfällung durch Dialyse gegen Phosphatpuffer $\mu = 0,005$, anschließender Ultrazentrifugation zur Entfernung der Lipide, Zonenelektrophorese und DEAE-Cellulose-

Abb. 2

Chromatogramm der Stufenelution einer β_1 A-Präparation der Kurzdarstellung an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher, die zur Darstellung einer hochgereinigten β_1 A-Präparation führt. Immunelektrophoretische Prüfung des 0,12M Eluates.

HSKO = Humanserumkontrolle

Anionenaustauscherchromatographie (1). Ein weiteres Verfahren wurde von SCHULTZE und Mitarbeitern (9) angegeben, welches von Präzipitat III des Rivanol-Ammoniumsulfatverfahrens ausgeht und über weitere Rivanol- und Ammoniumsulfatfällungen, zwischengeschaltete Dialyse, Zonenelektrophorese und Sephadex-Chromatographie zur Gewinnung von β_1 A-Globulin führt (9). Die von MÜLLER-EBERHARD beobachtete Thermolabilität von β_1 C-Globulin veranlaßte ihn zur Untersuchung der Beziehungen des Proteins zum Komplementsystem, die er für C_3' nachweisen konnte (2). Dagegen wiesen die zu β_1 A-transformierten Seren keine Komplementaktivität mehr auf. Zur Isolierung von β_1 C mußte MÜLLER-EBERHARD sein β_1 A-Darstellungsverfahren modifizieren, um es soweit abzukürzen, daß nicht während der Darstellung eine Transformation in β_1 A eintrat. Eine weitere, speziell auf die β_1 C-Globulin-Gewinnung ausgerichtete Methode beschrieb STEINBUCH (10). Sie gestattet die β_1 C-Globulingewinnung innerhalb von 24 Stdn. In der Präparation sind nur noch Spuren von β_1 A-Globulin neben β_1 C nachweisbar.

Alle Verfahren bedienen sich des Euglobulincharakters des β_1 A/C-Proteins und weisen als einen Reinigungsschritt die Dialyse gegen niedermolaren Puffer auf. Da diese jedoch einen erheblichen Zeitaufwand erfordert, erschien es empfehlenswert, ein neues, ohne Dialyse auskommendes Verfahren mitzuteilen, das mittels Hydroxylapatit-Säulenchromatographie arbeitet und innerhalb weniger Stdn. zur Darstellung von β_1 A-Globulin mit ausreichendem Reinheitsgrad führt.

Bemerkenswerterweise werden die Proteinbeimengungen, die regelmäßig (γ G-Globulin) oder nur gelegentlich (Coeruloplasmin) bei den derart gewonnenen β_1 A-Präparationen beobachtet werden, in der Serumoglobulinfraktion angetroffen. Da diese kontaminierenden Proteine eine erhöhte Hydroxylapatitaffinität aufweisen (Desorption erst ab 0,1M Phosphatpuffer, pH 6,8), lag ein Vergleich zwischen den Euglobulin-Hauptkomponenten und den Hydroxylapatit-affinen Proteinen nahe. Eine solche Gegenüberstellung weist tatsächlich eine weitgehende Übereinstimmung aus:

Serum-Euglobulin (11)	Hydroxylapatit-affine Serumproteine
Low density lipoproteins	α_2 (β)-Lipoprotein (Synonym: Low density lipoproteins)
γ G-Globulin (Anteil)	γ G-Globulin (Anteil)
Coeruloplasmin	Coeruloplasmin
β_1 A/C-Globulin	β_1 A/C-Globulin
γ M-Globulin	Gc-Globulin

Danach muß angenommen werden, daß die Proteineigenschaften, welche eine Präzipitation in ionenarmem Milieu gestatten, auch eine wesentliche Rolle beim Zustandekommen der Adsorption an Hydroxylapatit spielen. In dieser Hinsicht besonders aufschlußreich wären Untersuchungen über eine mögliche Spezifität des als Euglobulin fällbaren γ G-Anteils gegenüber dem Serum- γ G-Pseudoglobulinhauptanteil und ein Vergleich dieses γ G-Anteils mit der beschriebenen Hydroxylapatit-affinen γ G-Komponente, bei der es sich nach vorläufigen Untersuchungen um eine chromatographische γ G-Subfraktion handelt.

Ausnahmen in der obigen Gegenüberstellung bilden lediglich γ M- und Gc-Globulin. γ M wurde unter den angegebenen Versuchsbedingungen (pH 6,8) nur im 0,03M Phosphatpuffereluat nachgewiesen, Gc konnte bei Dialyse gegen Wasser (pH 7,0) nicht als Euglobulin gefällt werden.

Auf besondere Schwierigkeiten bei der Coeruloplasmin-Darstellung an Hydroxylapatit wurde schon von HJERTÉN (5) hingewiesen. Während der hier erörterten Versuche wurde der Eindruck gewonnen, daß das Desorptionsverhalten von Coeruloplasmin bei verschiedenen Hydroxylapatitchargen schwankt, und zwar über den Rahmen der relativ schwierigeren Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse hinaus, die dem Arbeiten mit Adsorbentien im Vergleich zu Austauschern nachgesagt wird. Daneben schien es, daß Coeruloplasmin dazu neigt, bei Puffern, deren Molaritäten noch erheblich tiefer liegen als die Molarität des zur vollständigen Coeruloplasmin-desorption führenden Puffers, bereits inkomplett zu desorbieren. Als Gründe für dieses Verhalten können mögliche Alterationen des Proteins während der Säulendurchpassage und echte chromatographische Heterogenität angeführt werden (12–15). Schwangeren-Seren sollten für die β_1 A-Darstellung wegen Hypercoeruloplasminämie nicht verwendet werden. Wegen der relativ geringen Molaritätsspanne der Puffer, die zunächst β_1 A-Globulin-, dann Coeruloplasmin-Desorption an Hydroxylapatit bedingen, war aus den oben angeführten Gründen eine Reihe von β_1 A-Globulin-Fractionen außer mit γ G auch mit Coeruloplasmin verunreinigt, meist jedoch nur soweit, daß es für die Immunelektrophorese unschwellig, im Mikro-Ouchterlony-Test jedoch nachzuweisen war.

Wie bereits ausgeführt, vermag die Rechromatographie der β_1 A-Fractionen an DEAE-Cellulose, auch im Rahmen einer zusätzlichen Coeruloplasmin-Darstellung, beide Kontaminationen vollständig zu eliminieren.

Literatur

- MÜLLER-EBERHARD, H. J., U. NILSSON und T. ARONSSON, J. Exper. Med. 111, 201 (1960). — 2. MÜLLER-EBERHARD, H. J. und U. NILSSON, J. Exper. Med. 111, 247 (1960). — 3. TISELIUS, A., S. HJERTÉN und Ö. LEVIN, Arch. Biochem. Biophysics 65, 132 (1956). — 4. ROELCKE, D. und W. HELMBOLD, Blut, 14, 331 (1967). — 5. HJERTÉN, S., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 31, 216 (1959). — 6. TURBA, F., Advances Enzymol. (New York) XXII, 417 (1960). — 7. SOBER, H. A. und H. A. PETERSON, Federat. Proc. 17, 116 (1958). — 8. LEVY, H. B. und H. A. SOBER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103, 250 (1960). — 9. SCHULTZE, H. E., K. HEIDE und H. HAUPT, Klin. Wschr. 40, 79 (1962). — 10. STEINBUCH, M., Vox Sang. 9, 96 (1964). — 11. SCHULTZE, H. E. und J. F. HEREMANS, Molecular Biology of Human Proteins, Vol. 1, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1966). — 12. BROMAN, L., Nature (London) 182, 1655 (1958). — 13. MORELL, A. G. und J. H. SCHEINBERG, Science (Washington) 131, 930 (1960). — 14. RICHTERICH, R., A. TEMPERLI und H. AEBI, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 56, 240 (1962). — 15. BROMAN, L. und K. KJELLIN, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 82, 101 (1964).

Dr. D. Roelcke
6900 Heidelberg, Voßstr. 2