Zur selektiven Bindung von α_1 -Antitrypsin an Trypsin- und Chymotrypsincellulose — Nachweis von Komplexen zwischen α_1 -Antitrypsin und Proteasen im Blutserum¹⁾

Von K. HOCHSTRASSER, K. HOCHGESAND, R. SCHUSTER, K. BAADER, F. PECHER, H. FRITZ
und N. HEIMBURGER

*Aus dem Biochemischen Laboratorium (Leitung Priv.-Doz. Dr. K. Hochstraßer) der HNO-Klinik
(Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann) der Universität München,
dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (komm. Dir. Prof. Dr. E. Werle)
der Universität München und den Behringwerken A. G. Marburg/Lahn*

(Eingegangen am 29. November 1972/27. Februar 1973)

Bei der einfachen zweidimensionalen Immunelektrophorese des α_1 -Antitrypsins werden bei verschiedenen pathologischen Zuständen Doppelgipfel beobachtet. Der zweite in Richtung Kathode verschobene Gipfel wird als Komplex zwischen α_1 -Antitrypsin und Proteasen interpretiert. Es wird ein Verfahren angegeben, durch das es möglich ist, freies inhibitorisch aktives α_1 -Antitrypsin selektiv durch Adsorption an unlösliche Trypsin- oder Chymotrypsincellulose aus dem Blutserum zu entfernen. Komplexgebundenes inhibitorisch inaktives α_1 -Antitrypsin verbleibt im Serum, ebenfalls eine bestimmte Menge α_1 -Antitrypsin mit geringer Affinität zu Enzymcellulose, das jedoch die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie normales α_1 -Antitrypsin besitzt.

The selective binding of α_1 -antitrypsin to trypsin- and chymotrypsin-cellulose. Demonstration of complexes between α_1 -antitrypsin and proteases in blood serum

In various pathological states, simple two-dimensional immunoelectrophoresis of the α_1 -antitrypsin gives double peaks. The second peak, which is nearer the cathode, is interpreted as a complex between α_1 -antitrypsin and proteases.

A method is described for the selective removal of α_1 -antitrypsin from blood serum by adsorption onto insoluble trypsin- or chymotrypsin-cellulose.

The existing complex-bound, inactive α_1 -antitrypsin remains in the serum, together with a definite quantity of α_1 -antitrypsin, which has a low affinity for the enzyme-cellulose, but the same electrophoretic mobility as normal α_1 -antitrypsin.

α_1 -Antitrypsin vermag Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, acrosomale und leukocytaire Proteasen zu hemmen (1—9). Der Hemmstoff bildet mit den Proteasen Komplexe, die eine andere Ladung als freies α_1 -Antitrypsin besitzen. Nach Mischen von Serum in vitro mit den entsprechenden Proteasen manifestieren sich die Komplexe in der einfachen Immunelektrophorese durch eine zweite Präzipitationslinie, die in Richtung Kathode verschoben ist (1, 13). In der zweidimensionalen Immunelektrophorese zeigt sich neben dem Präzipitationsgipfel des freien α_1 -Antitrypsins ein zweiter Gipfel, der von den entsprechenden Komplexen ausgeht (9—12). OHLSSON (10, 11) konnte nach Dauerinfusion von Trypsin und Chymotrypsin beim Hund im strömenden Blut Komplexe zwischen den Proteasen und α_1 -Antitrypsin nachweisen, die nach Absetzen der Infusion jedoch rasch aus dem Blutserum verschwinden. Vereinzelt Beobachtung von Doppelgipfeln bei der immunelektrophoretischen Darstellung von α_1 -Antitrypsin wurden schon als Komplexe mit Proteasen oder als genetische Varianten interpretiert (14). In Körpersekreten, wie Nasen- oder Bronchialsekret, konnten wir bei Entzündungen Doppelgipfel des α_1 -Antitrypsins feststellen. Wir interpretierten den zweiten kathodisch verschobenen α_1 -Antitrypsingipfel als Komplexver-

bindung zwischen α_1 -Antitrypsin und leukocytaeren Proteasen. Bei massiven Leukocytosen waren α_1 -Antitrypsindoppelgipfel im Liquor und auch im Serum nachweisbar (13). In Reihenuntersuchungen konnten wir bei bestimmten Krankheitsbildern im Serum ebenfalls Doppelgipfel feststellen. Die Interpretation des zweiten durchweg sehr kleinen α_1 -Antitrypsingipfels als Komplex mit Proteasen gründet sich bisher nur darauf, daß dieser Gipfel an der gleichen Stelle des Phorogramms liegt wie der zweite Präzipitationsgipfel, der nach Mischen von Serum mit Trypsin auftritt.

Die zu erwartende Bedeutung des Nachweises solcher Komplexe im strömenden Blut veranlaßte uns nach einer Möglichkeit für den Beweis zu suchen, daß der zweite Präzipitationsgipfel eine inhibitorisch inaktive Verbindung zwischen α_1 -Antitrypsin und Proteasen ist.

Material und Methoden

Agarose Behringwerke; Antihumanserum und Anti- α_1 -antitrypsinserum vom Kaninchen Behringwerke; Trypsin (EC 3.4.4.4) vom Rind, behandelt mit N-Tosyl-L-phenylalanin-chlor-methan, N⁶-Benzol-DL-arginin-4-nitroanilid von E. Merck Darmstadt; Trypsin polymer gebunden an CM-Cellulose, hergestellt

¹⁾ Die Arbeit wurde mit Mitteln des SFB 51 der deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

aus CM-Cellulosehydrazid (E. Merck) und Trypsin nach einer Vorschrift von E. Merck Darmstadt²⁾; Elektrophorese System Bioskamp.

Trypsin gebunden an CM-Cellulose (14a): Zur Herstellung wird zunächst CM-Cellulosehydrazid (E. Merck) in das Azid übergeführt. Dazu werden 1 g CM-Cellulose-hydrazid in 100 ml 0,5 mol/l HCl bei 2°C suspendiert und langsam 5 ml 50 g/l NaNO₂-Lösung zugegeben. Nach 20 min Rühren wird das CM-Celluloseazid abzentrifugiert und durch mehrmaliges waschen mit kaltem Wasser nitritfrei gemacht (KJ-Stärkepapper). Das CM-Cellulose-azid wird sofort in eine vorbereitete Lösung von 1 g Trypsin oder Chymotrypsin in 0,1 mol/l Triäthanolamin-HCl-Puffer pH 8,5 enthaltend 0,01 mol/l CaCl₂ eingerührt und die Suspension im Ultraturrax homogenisiert.

Nach 2 h wird das CM-Cellulose-Enzym-Konjugat abzentrifugiert. Durch Bestimmung der Trypsinmenge im Überstand kann festgestellt werden, wieviel des eingesetzten Enzyms polymer gebunden wurde (dies bedeutet nicht, daß das gesamte gebundene Enzymprotein auch enzymatisch aktiv ist, vgl. Ergebnisse). Nach Auswaschen von unspezifisch adsorbierten Enzym mit 0,2 mol/l Triäthylamin-HCl-Puffer pH 8,5 enthaltend 0,5 mol/l NaCl durch scharfes Zentrifugieren wird das feuchte Harz für die folgenden Untersuchungen verwendet (die Waschflüssigkeit darf keine Enzymaktivität mehr enthalten). Bei der Gefrier-trocknung verliert die Enzymcellulose die Fähigkeit zur Bindung von α_1 -Antitrypsin.

Hemmkapazität der Seren

Die Hemmwirkung der verwendeten Seren gegen Trypsin wurde anhand der Verminderung der Hydrolysegeschwindigkeit von N α -Benzoylarginin-4-nitroanilid durch Trypsin in Standardansätzen bestimmt (15).

Herstellung von α_1 -Antitrypsin-Trypsinkomplexen

Frisches Humanserum wird mit 0,4 mol/l Triäthanolamin-HCl-Puffer pH 7,8, enthaltend 0,4 mol/l NaCl im Verhältnis 1:1 vermischt. Es wird die Hemmkapazität in ImU (= Inhibitormillieinheiten) (15) bestimmt (etwa 90% der Hemmwirkung von Blutserum geht von α_1 -Antitrypsin aus). Im Falle des Trypsins gilt, daß 1 ImU etwa 1 μ g reines Trypsin zu hemmen vermag. Bei bekanntem Inhibitorgehalt des Serums ist es dann möglich, die Trypsinmenge zu berechnen, die zur Überführung eines definierten α_1 -Antitrypsinanteils in die Komplexverbindung notwendig ist. Nach Zugabe der berechneten Menge von Trypsin und Bestimmung der noch vorhandenen Hemmkapazität ist es möglich, die tatsächlich in den Komplex übergeführte Inhibitormenge zu berechnen.

Adsorption von α_1 -Antitrypsin an Trypsin- oder Chymotrypsin-cellulose

Zur Untersuchung der Adsorbierbarkeit von freiem α_1 -Antitrypsin an Enzymharz wird wie folgt vorgegangen: 2 ml Serumverdünnung mit bekanntem Inhibitorgehalt wird mit etwa 100 mg aus dem Herstellungsansatz abzentrifugiertem feuchtem Enzymharz versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugieren wird im Überstand die verbleibende Resthemmkapazität bestimmt. Ist noch Aktivität vorhanden, wird nochmals Harz zugesetzt und wieder etwa noch vorhandene Hemmaktivität bestimmt. Eine Resthemmaktivität von etwa 10% des Ausgangswertes ist nicht entfernbar. Diese Hemmwirkung geht von den übrigen Inhibitoren des Serums und einer geringen Menge nicht absorbierbarem α_1 -Antitrypsin aus. Bei diesem Vorgehen ist es möglich, diejenige minimale Harzmenge zu ermitteln, die zur Entfernung von α_1 -Antitrypsin notwendig ist. Die Verwendung von überschüssigen Harzmengen ist nicht möglich, da sonst sehr schnell Proteolyse mit Abbau von freiem und komplexgebundenem α_1 -Antitrypsin eintritt. Nach unseren Erfahrungen werden pro ml Serum 200–400 mg (es ist nicht möglich, standardisiertes Harz mit gleichbleibendem Trypsingehalt herzustellen) feuchtes Harz benötigt.

²⁾ Herrn Dr. Lang und Herrn Dr. Henrich sind wir für ihre Unterstützung sehr dankbar.

Untersuchungen zur Selektivität der Harzbehandlung

a) 1 ml Humanserum wird mit 1 ml Puffer (siehe 1) verdünnt und mit Trypsinharz bis zum Verschwinden von 90% der Hemmwirkung behandelt. Nach Zentrifugieren und Filtrieren des Überstandes wird durch Zugabe von 8 μ l Propiolacton modifiziert (2 h 37°C). Unbehandeltes Serum wird ebenfalls modifiziert und von beiden Proben eine zweidimensionale Simultanimmunelektrophorese gegen Antihumanserum durchgeführt (Abb. 2, 3). Methodik nach STEPHAN und FRAHM (16).

b) Serum, dessen α_1 -Antitrypsin durch Zugabe von Trypsin zu etwa 30% in Komplex übergeführt wurde, wird mit Trypsinharz wie oben beschrieben behandelt, auf etwa 90prozentige Entfernung der Hemmwirkung geprüft, zentrifugiert und filtriert. Die elektrophoretische Untersuchung des komplexierten (Abb. 4) und des harzbehandelten komplexierten (Abb. 5) Serums mit Anti- α_1 -antitrypsinserum zeigt, daß die Gipffläche des freien α_1 -Antitrypsins im behandelten Serum jedoch stark erniedrigt ist. Die Untersuchung erfolgt wie unter a) beschrieben.

Elektrophorese

Die zweidimensionale Immunelektrophorese von α_1 -Antitrypsin und Komplexen wird nach LAURELL bei pH 8,0 durchgeführt (17). Bei diesem pH ist eine Auftrennung der genetisch bedingten Varianten (18, 19) des α_1 -Antitrypsins nicht zu beobachten.

Ergebnisse

Wird Serum mit steigenden Mengen Trypsin versetzt und jeweils immunelektrophoretisch untersucht, so zeigt sich, daß ein zweiter Präzipitationsgipfel erscheint. Die Fläche dieses Gipfels nimmt mit steigender Trypsinmenge zu, während die Fläche des auf freies α_1 -Antitrypsin entfallenden Gipfels abnimmt. Die Hemmkapazität des Serums gegen Trypsin nimmt dabei laufend ab und verschwindet nahezu vollständig. Daraus folgt, daß der neu entstandene Gipfel durch α_1 -Antitrypsin, gebunden an Trypsin, hervorgerufen wird. Das α_1 -Antitrypsin dieses Gipfels ist immunologisch nachweisbar, inhibitorisch aber inaktiv.

Gelingt es, freies aktives α_1 -Antitrypsin selektiv aus einem Serum mit α_1 -Antitrypsindoppelgipfel zu entfernen, so wäre im konkreten Fall bewiesen, daß ein Komplex mit Proteasen vorliegt.

Wir versuchten daher die Entfernung von freiem α_1 -Antitrypsin aus dem Serum durch selektive Bindung an Trypsin- oder Chymotrypsinharz zu erreichen. Mit käuflichen lyophilisierten Harzen gelang dies nicht.

Bei der Herstellung von Enzymharzen wird das Enzym in der Regel über freie NH₂-Gruppen und ein Zwischenglied an die Harzmatrix gebunden. Das Enzym wird dabei in statistischer Streuung in verschiedener räumlicher Anordnung gebunden. In einem solchen Harz kommen Trypsinmoleküle mit unterschiedlicher Reaktivität vor. Von solchen Harzen werden niedermolekulare Substrate gut umgesetzt und auch niedermolekulare Inhibitoren bei guter Reversibilität gebunden (20, 21). Behinderungen der Reaktionen sind hier offensichtlich nicht von Bedeutung.

α_1 -Antitrypsin besitzt jedoch ein Molekulargewicht von etwa 45000. Die reaktiven Zentren dieses Inhibitors für Trypsin oder Chymotrypsin sind wahrscheinlich räumlich so fixiert, daß es nur mit bestimmten, am Harz leicht zugänglichen Enzymmolekülen reagieren kann. In

Abb. 1

Immunelektrophorese von Humanserum mit Leukocytose. 2 μ l Serum; 70 μ l Anti- α_1 -Antitrypsin in 3 ml Präzipitationsgel
1 = α_1 -Antitrypsin
2 = komplexiertes α_1 -Antitrypsin

Abb. 3

Simultanimmunelektrophorese von Humanserum nach Behandlung mit Trypsinharz und Modifizierung mit β -Propiolacton, 2 μ l Serum: 240 μ l Antihumanserum im Präzipitationsgel

Abb. 2

Simultanimmunelektrophorese von Humanserum nach Modifizierung mit β -Propiolacton. 2 μ l Serum; 240 μ l Antihumanserum im Präzipitationsgel

Abb. 4

Immunelektrophorese von Humanserum nach Komplexbildung von 30% des α_1 -Antitrypsins mit Trypsin, Bedingungen wie Abbildung 1
1 = freies α_1 -Antitrypsin
2 = komplexiertes α_1 -Antitrypsin

unserem Arbeitskreis auf CM-Cellulosebasis hergestelltes unlösliches Trypsin- bzw. Chymotrypsinharz enthält einen geringen Prozentsatz Enzym in dieser Weise gebunden, da es mit α_1 -Antitrypsin des Serums reagieren kann. Bei Inkubation von Serum mit geringen Mengen Harz im „batch“-Verfahren verschwindet die Hemmwirkung innerhalb von 15 min im filtrierten Überstand zu etwa 90%. Den Nachweis, daß es sich hierbei um selektive Bindung des Inhibitors an Harz handelt und nicht um proteolytischen Abbau, führten wir dadurch, daß von unbehandeltem und harzbehandeltem Serum eine zweidimensionale Simultanimmunelektrophorese durchgeführt wurde. Abbildung 2 und 3 zeigen das Ergebnis. Im harzbehandelten Serum (Abb. 3) ist der α_1 -Antitrypsingipfel (dritter Gipfel nach Albumin) im Vergleich zum unbehandelten

Serum (Abb. 2) stark erniedrigt, während alle übrigen Serumproteine noch in praktisch gleicher Relation vorhanden sind.

Die hohe Selektivität der Methode ist auch gewährleistet bei der Entfernung von freiem α_1 -Antitrypsin aus komplexhaltigen Seren. Durch Mischen von Serum mit Trypsin wird komplexhaltiges Serum hergestellt. Von dieser Lösung wird ein Pherogramm mit monovalentem Anti- α_1 -antitrypsinserum angefertigt (Abb. 4) ein aliquoter Teil mit Trypsinharz behandelt und ebenfalls ein Pherogramm hergestellt (Abb. 5). Es zeigt sich, daß die Gipfelhöhen, die auf die Komplexverbindung entfallen, vor und nach Harzbehandlung praktisch gleich bleiben. Die Fläche des α_1 -Antitrypsingipfels ist nach Harzbehandlung stark erniedrigt. Eine vollständige Entfernung des freien α_1 -Antitrypsins gelang nur in

Abb. 5

Immunelectrophorese von Humanserum nach Komplexbildung von 30% des α_1 -Antitrypsins mit Trypsin und nachfolgender Behandlung mit Trypsinharz. Bedingungen wie Abbildung 2
1 = freies α_1 -Antitrypsin
2 = komplexiertes α_1 -Antitrypsin

Abb. 6

Immunelectrophorese von Humanserum mit Leukocytose nach Behandlung mit Trypsinharz. Aufgetragene Serummenge jetzt 8 μ l. Bedingungen wie Abbildung 1
1 = freies α_1 -Antitrypsin
2 = komplexiertes α_1 -Antitrypsin

wenigen Fällen. Im Serum kommt offensichtlich eine besondere α_1 -Antitrypsinform vor, die nicht mit Trypsinharz reagiert. Wir besitzen Hinweise, daß das verbleibende α_1 -Antitrypsin eine höhere Dissoziationskonstante im Komplex mit Proteasen besitzt als normales α_1 -Antitrypsin. Dies könnte als Ursache für die Nichtabsorbierbarkeit diskutiert werden. Über dieses Problem werden wir gesondert berichten.

Bei großem Überschuß von Trypsinharz tritt Proteolyse ein. Es verschwindet auch die Komplexverbindung und es treten Abbauprodukte des α_1 -Antitrypsins auf, die sich in der Immundiffusion als Doppelringe bemerkbar machen (46).

Zur Prüfung der Methodik im konkreten Fall wurde das Serum eines Patienten mit massiver Leukocytose (Abb. 1) analog behandelt. In Abbildung 6 ist das

gleiche Serum nach Harzbehandlung dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß nun eine quantitative Auswertung des Komplexes möglich ist. Nach Aufstellung einer Eichkurve, die die Abhängigkeit der Gipffläche der Komplexverbindung von der Menge in Komplex übergeführtes α_1 -Antitrypsin angibt, kann die als Komplex vorliegende α_1 -Antitrypsinmenge quantitativ bestimmt werden (13).

Diskussion

Die physiologische Funktion des α_1 -Antitrypsins wurde erstmals erkannt, als festgestellt wurde, daß hereditärer Mangel an α_1 -Antitrypsin im Serum häufig mit Lungemphysemen korreliert ist (10, 22–31). Erklärt werden diese Befunde mit der aus dem Inhibitormangel resultierenden Verminderung der Hemmung von Proteasen aus zerfallenen Leukocyten und Bakterien in den Lungenalveolen (Übersichtsliteratur s. l. c. (32)). Es wurde versucht, auch die Entstehung von Bronchiektasien in dieser Weise zu deuten, da auch im Bronchialsekret α_1 -Antitrypsin vorkommt. Es ist jedoch bekannt, daß bei α_1 -Antitrypsinmangel nicht in jedem Falle auch Bronchiektasien auftreten. Dies ist erklärbar, da nach unseren Untersuchungen im Bronchialsekret ein weiterer niedermolekularer Inhibitor vorkommt (33–37), der ein ähnliches Hemmspektrum wie α_1 -Antitrypsin besitzt und auch bei genetisch bedingtem Ausfall der α_1 -Antitrypsin-Produktion gebildet wird (38). Abgesehen von der Bedeutung des α_1 -Antitrypsins für die Pathophysiologie des Respirationstraktes, kommt dem α_1 -Antitrypsin im Kreislauf selbst eine wichtige Rolle zu. Zunächst ist hierbei an die laufende physiologische Aktivierung von Plasmin zu denken, die nur in Gegenwart von entsprechenden Inhibitoren im Gleichgewicht bleibt. Auch verschiedene lysosomale Proteasen, freigesetzt durch Gewebsuntergang (39, 40), könnten über die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems ohne ausreichenden Inhibitorschutz bei banalen Krankheitsfällen zur Auslösung eines Schocks mit sämtlichen Folgen führen. Durch Infusion von Kallikrein oder Trypsin bis zur Erschöpfung des inhibierenden Systems können tödliche Schockzustände erzeugt werden. Ähnliche Vorgänge müßten beim gehäuften Auftreten und Zerfall von weißen Blutzellen und bei Gerinnungsvorgängen mit Aktivierung zahlreicher Proteasen ausgelöst werden (41–45). Aufgrund der geschilderten pathophysiologischen Möglichkeiten ist anzunehmen, daß bereits auch physiologischerweise im Blut geringe Mengen von komplexgebundenen Inhibitoren kreisen.

Treffen unsere Vermutungen zu, so müßte der Spiegel von komplexgebundenen Inhibitoren bei Entzündungsvorgängen verschiedener Genese erhöht sein. Nach unseren bisherigen Erfahrungen trifft dies zu.

Die bekannte Tatsache der absoluten Erhöhung des α_1 -Antitrypsinspiegels bei entzündlichen Prozessen (42) scheint diesem Sachverhalt zunächst zu widersprechen, doch könnte der erhöhte Verbrauch von α_1 -Antitryp-

sin durch Komplexbildung mit Protasen als gegenregulatorischen Effekt eine gesteigerte Inhibitorproduktion bewirken. Mit der von uns entwickelten Methode zum Nachweis von Inhibitor-Proteasen-Kom-

plexen dürften sich diese Fragestellungen beantworten lassen, wenn es im Verlauf unserer Untersuchungen möglich ist, auch die an der Komplexbildung jeweils beteiligten Proteasen zu identifizieren.

Literatur

1. HEIMBURGER, N., HAUPT, H. & SCHWICK, H. G. (1971), in: Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (FRITZ, H. & TSCHESCHE, H., Hrsg.) S. 1—22, W. de Gruyter, Berlin. —
2. FRITZ, H., WUNDERER, G., KUMMER, K., HEIMBURGER, N. & WERLE, E. (1972), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 906 bis 910. —
3. LIEBERMANN, I. & GAWAD, M. A. (1971), J. Lab. Clin. Med. 77, 713—727. —
4. OHLSSON, K. (1971), Scand. J. Lab. Invest. 28, 251—254. —
5. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., MATZNER, M. & WERLE, E. (1971), diese Z. 10, 104—107. —
6. KUEPPERS, F. & BEARN, A. G. (1966), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 1207. —
7. SCHUMACHER, G. F. B. (1971), Contraception 4, 67—78. —
8. GAUS, H. & TAU, B. H. (1967), Clin. Chim. Acta 17, 111—117. —
9. FRITZ, H., HEIMBURGER, N., MEIER, M., ARNOLD, M., ZANEVELD, L. J. D. & SCHUMACHER, G. F. B. (1972), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1953—1956. —
10. OHLSSON, K. (1971), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28, 225—230. —
11. OHLSSON, K. (1971), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28, 13—19. —
12. OHLSSON, K. (1971), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28, 5—11. —
13. HOCHSTRASSER, K., SCHUSTER, R., REICHERT, R. & HEIMBURGER, N. (1972), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1120—1124. —
14. LAURELL, C. B. (1965), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17, 271—274. —
- 14a. BRÜMMER, W., HENNICH, N., KLOCHOW, M., LANG, H. & ORTH, H. H. (1972), Eur. J. Biochem. 25, 129—135. —
15. FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I. & WERLE, E. (1970), in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMAYER, H. U., Hrsg.) Aufl. 2, Bd. I, S. 1021—1037, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße. —
16. STEPHAN, N. & FRAHM, U. (1971), diese Z. 9, 224—228. —
17. LAURELL, C. B. (1965), Anal. Biochem. 10, 358—361. —
18. FAGERHOLM, M. K. & BRAEND, M. (1965), Science 149, 986. —
19. FAGERHOLM, M. K. & LAURELL, C. B. (1967), Clin. Chim. Acta 16, 199—203. —
20. FRITZ, H., MÜLLER, I., WIEDEMANN, M. & WERLE, E. (1967), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 405—418. —
21. FRITZ, H., SCHULT, H., HUTZEL, M., WIEDEMANN, M. & WERLE, E. (1967), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 308—312. —
22. LAURELL, C. B. & ERIKSON, S. (1963), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15, 529—538. —
23. ERIKSON, S. (1964), Acta Med. Scand. 175, 197—205. —
24. TARKOFF, M. P., KUEPPERS, F. & MÜLLER, W. F. (1968), Amer. J. Med. 45, 220—228. —
25. KEWALYSKY, T. & SATALINE, L. R. (1969), Chest 55, 285—289. —
26. GANROT, D. O., LAURELL, V. B. & ERIKSON, S. (1967), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 19, 205—208. —
27. TALAMO, R. C., BLENNERHASSETT, J. P. & AUSTEN, K. F. (1966), New. Engl. J. Med. 275, 1301—1304. —
28. BRISCOE, W. A., KUEPPERS, F. & DAVIS, A. L. (1966), Amer. Rev. Resp. Dis. 94, 529—539. —
29. TALAMO, R. C., AUSTEN, K. F. & ALLEN, J. D. (1967), Aspen Emphysema Conf. 10, 491—495. —
30. WELCH, M. H., RIENECKE, M. H. & HAMMERSTEIN, J. F. (1969), Ann. Internat. Med. 71, 533—542. —
31. GUENTER, C. A., WELCH, M. H. & RUSSEL, T. R. (1968), Arch. Intern. Med. 122, 254—257. —
32. MITTMAN, M., (Hrsg.) Pulmonary Emphysema and Proteolysis (1972), Academic Press, New York and London. —
33. HOCHSTRASSER, K., HAENDLE, H., REICHERT, R. & WERLE, E. (1971), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 954—958. —
34. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S. & WERLE, E. (1972), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 221—226. —
35. REICHERT, R. & HOCHSTRASSER, K. (1972), Z. Laryngol. Rhinol. 51, 190 bis 193. —
36. REICHERT, R. & HOCHSTRASSER, K. (1972), Z. Laryngol. Rhinol. 51, 73—80. —
37. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K. & CONRADI, G. (1972), Pneumologie 147, 13—20. —
38. REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., FRUHMANN, G., FRITZ, H. & WERLE, E. (1972), Pneumologie 147, 41—54. —
39. FRIMMER, M. (1971), Int. Z. Klin. Pharmacol. Tox. 2, 144—151. —
40. JAROFF, A. (1972), Ann. Rev. Med. 23, 177—190. —
41. GREENBAUM, L. M., CARRARA, M. C. & FREER, R. (1968), Fed. Proc. 27, 90—91. —
42. ENGLEMAN, E. G. & GREENBAUM, L. M. (1971), Biochem. Pharm. 20, 922—924. —
43. WEBSTER, M. (1968), Fed. Proc. 27, 84—89. —
44. FREY, E. K., KRAUT, H. & WERLE, E. (1968), Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Ferd. Enke-Verlag, Stuttgart. —
45. HOMER, G. M., ZIPF, R. E., HIEBER, T. E. & KOTCHMAN, B. J. (1960), Amer. J. Clin. Path. 34, 99. —
46. LIEBERMAN, J. & MITTMAN, CH (1972), Amer. Thoracic Soc. Meeting, Kansas City, May 22.

Priv.-Doz. Dr. K. Hochstraßer
HNO-Klinik d. Universität
8000 München 2
Pettenkoferstr. 4a