Adsorption von Lipoproteiden

Behandlung von Seren mit Adsorbentien, I. Mitteilung

Von W. STEPHAN und L. RÓKA

Aus der Wissenschaftlichen Abteilung der „Biotest“-Serum-Institut GmbH, Frankfurt/Main
(Leiter: Prof. Dr. L. Róka)

(Eingegangen am 31. August 1967)

Es wird eine Methode beschrieben, mit kolloidaler Kieselsäure α_1 -, α_2 - und β -Lipoproteide aus Human-Seren zu entfernen.

Die Adsorption ist nahezu selektiv, so daß die Proteinzusammensetzung bezüglich der anderen Serumproteine nicht wesentlich verändert wird.

Es handelt sich um eine sehr schonende Methode, wie die gute Verträglichkeit der behandelten Seren sowie die Wiedergewinnung der empfindlichen Lipoproteide erkennen lassen.

Verbunden mit der Entfernung der Lipoproteide ist eine Erhöhung der Lagerstabilität.

Nach AEROSIL-Behandlung von Menschen-Seren werden die Serumproteine bereits durch β -Propiolacton-Konzentrationen modifiziert, die bei Nativserum noch wirkungslos sind.

Parallel dazu wird durch AEROSIL-Behandlung die rasche β -Propiolacton-Hydrolyse im Serum beseitigt, möglicherweise durch Entfernung einer β -Propiolacton-Hydrolase.

A method is described for the removal of α_1 -, α_2 - and β -lipoproteins from human sera with colloidal silicic acid (AEROSIL).

The adsorption is essentially selective, so that the protein composition with respect to the other serum proteins is practically unchanged.

The method is very protective, as shown by the susceptibility of treated sera and the recovery of the sensitive lipoproteins.

With removal of the lipoproteins, sera became more stable to storage.

After the treatment of human sera with AEROSIL, the serum proteins are readily modified by concentrations of β -propiolactone that are inactive with native sera.

AEROSIL-treatment also removes the activity for the rapid hydrolysis of β -propiolactone, possibly by removal of a β -propiolactone hydrolase.

Die kolloidale Kieselsäure Aerosil dient bei der Coeruloplasmin-Darstellung aus Placentaflüssigkeit zur Entfernung von Lipiden und Lipoproteiden (1).

Es interessiert die Frage, unter welchen Bedingungen eine quantitative Entfernung der Lipoproteide aus Seren vom Menschen möglich ist und in welchem Umfang hierbei Serumeigenschaften, wie Proteinzusammensetzung, Enzymaktivität, Verträglichkeit und Lagerstabilität, verändert werden.

Ergebnisse

Adsorption von Lipoproteiden

Die Lipoproteide von Menschen-Seren lassen sich verschieden gut an die besonders oberflächenreiche Kieselsäure Aerosil (2) (spez. Oberfläche 340 m²/g) adsorbieren.

Rühren mit 2% Aerosil während 2 Stunden bei Zimmertemperatur in physiologischem pH-Bereich entfernt nur α_2 - und β -Lipoproteide quantitativ. Zur quantitativen Adsorption von α_1 -Lipoproteiden muß bei erhöhter Temperatur (45°) länger (4 Stdn.) adsorbiert werden.

Optimale Bedingungen für die Adsorption aller Lipoproteide sind:

Rühren mit 2 g Aerosil pro 100 ml Serum während 4 Stdn. bei 45° im pH-Bereich 7–8.

Zur Kontrolle der Adsorptionsprozesse benutzten wir die Immunelektrophorese (3) (Abb. 1).

Proteinzusammensetzung

Die bevorzugte Adsorption von Proteinen mit größerem Molekulargewicht an Aerosil läßt sich im Elutionsdiagramm einer Sephadex-Gel-Filtration von Menschen-Serum zeigen (Abb. 2).

Abb. 1
Immunelektrophoretische Auftrennung von unbehandeltem Serum (oben) und AEROSIL-behandeltem Serum (unten) Darstellung mit Anti-Humanserum vom Pferd

Abb. 2
Gelfiltration an Sephadex G 150 (Phosphatpuffer pH 8,0)
—: unbehandeltes Serum
----: AEROSIL-behandeltes Serum

Nach Adsorption ist die erste Fraktion der Gelfiltration, die die Proteine mit den höchsten Molekulargewichten enthält, um etwa 30% erniedrigt (Abb. 2), während die anderen Anteile — zweite und dritte Fraktion — praktisch konstant bleiben. Die quantitative Papier-elektrophorese zeigt ein deutliches Absinken der β -Globuline (Tab. 1).

Hier gibt offensichtlich das zu 300 mg/100 ml im Serum des Menschen vorkommende β -Lipoprotein (4) den Ausschlag.

Tab. 1

Quantitative Papierelektrophorese vor und nach AEROSIL-Behandlung von Menschenserum

Fraktion	Proteinkonzentration unbehandeltes Serum	(Relativprozente) adsorbiertes Serum
Albumin	61,3	63,2
α_1 -Globulin	4,8	6,6
α_2 -Globulin	6,4	7,4
β -Globulin	11,6	8,6
γ -Globulin	15,9	14,2

Tab. 2

Antikörpertiter in Menschenserum vor und nach AEROSIL-Behandlung

Antikörper gegen	Titer	
	Vor Adsorption	Nach Adsorption 2% Aerosil, 4 Stdn., 45°
Blutgruppenantigen A ₁	1:64	1:64
Blutgruppenantigen B	1:64	1:64
Herpes (Neutralisationstest)	1:160	1:160
Masern (Hämagglutinations-Hemmungstest)	1:1024	1:1024
Polio I (Neutralisationstest)	1:40	1:40

Der γ -Globulingehalt wird nur unwesentlich reduziert. Tabelle 2 zeigt, daß die spezifischen Antikörpereigenschaften voll erhalten bleiben.

Enzym-Aktivität

„ β -Propiolacton-Hydrolase-Aktivität“

Behandelt man Plasma mit 0,3 g β -Propiolacton pro 100 ml Plasma bei + 5° für 2 Std. so werden nach Lo GRIPPO (5) die Plasmaproteine nicht modifiziert bzw. denaturiert. Es wurde nun gefunden, daß dies im allgemeinen auch für Serum gilt, jedoch nicht für Aerosil-behandelte Seren. Die immunoelektrophoretische Analyse zeigt, daß β -Propiolacton die Proteine eines mit Aerosil behandelten Serums verändert (Abb. 3).

Alle Proteine zeigen stark erhöhte elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit. Am stärksten ausgeprägt ist dieser Effekt beim Albumin, dessen elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit auch bei β -Propiolacton-Behandlung eines frischen nativen Serums geringfügig erhöht wird (Abb. 4).

Nimmt man eine Reaktion von β -Propiolacton mit der NH_2 -Gruppe der Serumproteine gemäß folgendem Schema an,

so liegt die Erhöhung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit in einer Erhöhung der negativen Ladung der Proteine infolge Acylierung der NH_2 -Gruppen begründet.

Die Ursache der unterschiedlichen Reaktion von β -Propiolacton mit frischem Serum und aerosil-behandeltem Serum könnte mit der Hydrolysegeschwindigkeit von β -Propiolacton zusammenhängen. Diese ist in frischem Serum sehr viel größer als in adsor-

Abb. 3

Immunelektrophoretische Auftrennung von frischem Serum (oben) und AEROSIL-behandeltem Serum (unten), nach Einwirkung von β -Propiolacton. Darstellung mit Anti-Humanserum vom Kaninchen

Abb. 4

Immunoelektrophoretische Auftrennung von frischem Serum (oben) und frischem Serum nach Einwirkung von β -Propiolacton (unten). Darstellung mit Anti-Humanserum vom Kaninchen

biertem Serum, wo sie etwa die gleiche Größe hat wie in Wasser von gleichem pH-Wert.

Die Hydrolyse in frischem Serum verläuft so rasch, daß für die damit konkurrierende, jedoch viel langsamere Reaktion von β -Propiolacton mit den NH_2 -Gruppen der Serumproteine keine nennenswerte Menge β -Propiolacton übrigbleibt. Erst wenn nach Adsorption die Hydrolysegeschwindigkeit stark verlangsamt ist, tritt die Modifizierung in den Vordergrund:

Die Länge der Pfeile ist ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit.

Aus diesem Schema folgt, daß bei der Acylierung der Protein-NH₂-Gruppen durch β -Propiolacton im Gegensatz zur Hydrolyse keine titrierbaren H⁺-Ionen auftreten. Der titrierbare Anteil β -Propiolacton ist also um so geringer, je mehr die Proteinmodifizierung in den Vordergrund tritt. Diese verminderte Hydrolyse von β -Propiolacton in aerosil-behandeltem Serum zeigt Abbildung 5.

Möglicherweise beruht die erhöhte Hydrolyse von β -Propiolacton verglichen mit Wasser darauf, daß im Serum eine Hydrolase die Hydrolyse von β -Propiolacton katalytisch beschleunigt. Dieses Enzym wird dann offenbar an Aerosil adsorbiert und so aus dem Serum entfernt. Wie nachfolgend gezeigt wird, ist diese Hydrolaseaktivität aus dem Aerosil-Niederschlag eluierbar.

Lagerstabilität

Aerosil-behandeltes, lipoproteidfreies Serum ist im Vergleich zum unbehandelten Serum wesentlich lager-

Abb. 5
Hydrolyse von β -Propiolacton in Serum
—: frisches Serum
----: AEROSIL-behandeltes Serum

stabiler. Als quantitatives Maß hierfür erweist sich der Niederschlag nach 4 Wochen Wechsellagerung bei 45° und 5° (Tab. 3).

Tab. 3

Niederschläge denaturierter Lipoproteide vor und nach AEROSIL-Behandlung von Menschenserum nach 4 Wochen Wechsellagerung bei 45° und 5°

Serum No.	mg/100 ml Serum Ausgangsserum	mg/100 ml Serum Adsorbiertes Serum
1	3,7	0,1
2	4,6	0,25
3	2,9	0,05

Durchschnittlich liegen die Niederschläge in aerosil-behandeltem Serum um einen Faktor in der Größenordnung von 10 niedriger als in unbehandeltem Serum. Diese Erhöhung der Lagerstabilität durch Entfernung der Lipoproteide steht in Übereinstimmung mit den Befunden immunoelektrophoretischer Untersuchungen gelagerter Seren (Abb. 6 und 7).

Man erkennt im Lipoproteidbereich starke Denaturierungen; bei Lagerung bis zu 2 Jahren bleibt diese im wesentlichen auf die Lipoproteide beschränkt, um bei längerer Lagerung, insbesondere bei steigender Temperatur, auch auf andere Serumproteine überzugreifen.

Verträglichkeit

Die durchgeführten Pyrogenteste sowie die Prüfung auf akute und chronische Verträglichkeit ergaben volle Verträglichkeit der mit Aerosil behandelten Seren. Als Beispiel soll die Leukocytenkurve einer Verträglichkeitsprüfung dienen (Abb. 8).

Beim Vergleich beider Kurven sieht man, daß der antigene Reiz des artfremden Eiweißes bei einem unbehandelten Serum bedeutend größer ist als bei einem adsorbierten Serum. Dies könnte am intakten Komplementsystem des frischen Serums und an Enzymen liegen, die durch den Adsorptionsvorgang inaktiviert werden.

Die gute Verträglichkeit des Aerosil-behandelten Serums zeigt, daß die Entfernung der Lipoproteide durch Aerosil offenbar eine sehr schonende Methode darstellt. Dies wird bestätigt durch die Tatsache, daß zahlreiche Proteine aus dem Aerosil-Niederschlag zum

Abb. 6
Immunelektrophoretische Auftrennung
(Proteinfärbung mit Amidochwarz)
von frischem Serum (oben) und gelagertem Serum (unten) (2 Jahre 20°).
Darstellung mit Anti-Humanserum vom Pferd

Abb. 7
Immunelektrophoretische Auftrennung
(Fettfärbung mit Ölrot)
von frischem Serum (oben) und gelagertem Serum (unten) (5 Jahre 20°).
Darstellung mit Anti-Humanserum vom Pferd

Abb. 8
Chronische Verträglichkeitsprüfung
(Leukocytenzahl)
—: AEROSIL-behandeltes Serum
----: Ausgangsserum

Abb. 9
Extraktion von an AEROSIL adsorbierten Proteinen
links: Extraktion bei pH 9,0
rechts: Extraktion mit 12proz. NaCl-Lösung

Teil undenaturiert eluierbar sind, darunter die β -Propiolacton-Hydrolase.

Extraktion des Aerosil-Niederschlages

Durch Anwendung hoher Salzkonzentrationen läßt sich im alkalischen pH-Bereich aus dem proteinfrei gewaschenen Aerosil-Niederschlag ein Großteil der adsorbierten Proteine extrahieren (Abb. 9).

Den Extrakt mit der höchsten Proteinkonzentration erhält man durch Einwirken von 12proz. NaCl-Lösung bei pH 9,0, wobei der pH-Wert während der Extraktion laufend mit 1N NaOH bis zur Konstanz nachgestellt wird (Abb. 9).

Eine charakteristische Zusammensetzung des Extraktes zeigt die Gelfiltration: Während im adsorbierten Serum die Proteine mit niedrigem Molekulargewicht (Fraktion III, Hauptbestandteil: Albumin) den Hauptanteil bilden, besteht der Extrakt überwiegend aus Anteilen mit höheren Molekulargewichten (Fraktion I) (vgl. Abb. 2).

Lipoproteide

Die immunologische Untersuchung extrahierter Fraktionen im Ouchterlony-Test zeigt, daß in allen Fraktionen (Abb. 10a) unabhängig vom Salzgehalt α_1 -Lipoprotein enthalten ist, während α_2 - und β -Lipoproteide erst bei einer Salzkonzentration ab 20% (pH 9,0) extrahiert werden (Abb. 10b). Diese fraktionierte Extraktion steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß α_1 -Lipoprotein deutlich schwächer adsorbiert wird als α_2 - und β -Lipoprotein.

Immunelektrophoretisch ergibt sich eine erstaunlich geringe Denaturierung der eluierten Lipoproteide (Abb. 11 und 12).

β -Propiolacton-Hydrolaseaktivität

Die β -Propiolacton-Hydrolaseaktivität in den einzelnen Extrakten zeigt Abbildung 13.

Extraktion bei pH 9,0 mit 15proz. NaCl-Lösung reichert die β -Propiolacton-Hydrolaseaktivität an.

Vergleicht man die Aktivität von Ausgangsserum und Extrakt bei gleicher Proteinkonzentration, ergibt sich eine 3,5fache Anreicherung der β -Propiolacton-Hydrolaseaktivität im Extrakt (Abb. 14).

Weitere Versuche sollen die hypothetische Hydrolase genauer charakterisieren.

Beschreibung der Versuche

Aerosil-Adsorption

Zu 100 ml Serum (Proteinkonzentration 7,5%, pH 7,2–7,8) gibt man 2,0 g Aerosil 2491/380¹⁾, rührt 4 Stdn. im Wasserbad bei 45°; danach wird abgekühlt und 20 Min. bei 5000 U./Min. zentrifugiert. Der Überstand wird abgesehen. Ausbeute etwa 80%.

Die gewünschte Proteinkonzentration wird eingestellt und durch Seitz-Filter EKS 1 sterilfiltriert.

Messung der β -Propiolacton-Hydrolyse

Die Bestimmung wurde mit einer Kombination von Titrigraph, Titrator und Autobürette der Fa. Radiometer, Kopenhagen, durchgeführt. Die Eichung erfolgte mit Puffertitrisol pH 8,0 bei 20°.

20 ml der zu testenden Lösung (z. B. 5 ml Serum + 15 ml physiol. NaCl-Lösung) werden vorgelegt und auf pH 8,0 eingestellt. Dann werden 0,125 ml β -Propiolacton (= 2 mMol) zugefügt und mit 2 ml physiol. NaCl-Lösung nachgespült. Man titriert mit 1N NaOH etwa 10 Min. und registriert den NaOH-Verbrauch pro Zeit. Aus dem durchschnittlichen Verbrauch an 1N NaOH in der Anfangsphase der Hydrolyse, bezogen auf 1 g Protein und 1 Min., ergibt sich die spezifische Aktivität des entspre-

Abb. 10 (a + b)
Ouchterlony-Analyse der Extrakte
g₁: Anti- α_1 -Lipoprotein
g₂: Anti- α_2 -Lipoprotein

a: Eluiert mit 2proz. NaCl d: Eluiert mit 16proz. NaCl
b: Eluiert mit 4proz. NaCl e: Eluiert mit 20proz. NaCl
c: Eluiert mit 8proz. NaCl f: Eluiert mit 30proz. NaCl

Abb. 11
Immunelektrophoretische Auftrennung von frischem Serum (oben) und Eluat (unten) (20% NaCl, pH 9,0). Darstellung mit Anti- α_1 -Lipoprotein-Serum vom Kaninchen

Abb. 12
Immunelektrophoretische Auftrennung von frischem Serum (oben) und Eluat (unten) (20% NaCl, pH 9,0). Darstellung mit Anti- α_2 -Lipoprotein-Serum vom Kaninchen

Abb. 13
 β -Propiolacton-Hydrolaseaktivität der Extrakte
—: Protein-Konzentration
---: β -Propiolacton-Hydrolaseaktivität

chenden Serums bzw. Eluats bezüglich der Hydrolyse von β -Propiolacton ausgedrückt in $\mu\text{Mol/g} \cdot \text{Minute}$.

β -Propiolacton-Behandlung

Frisches Serum

Das zu behandelnde Serum wird auf 5° abgekühlt und 0,3 g β -Propiolacton pro 100 ml Serum zugegeben. Man läßt 1 Std. bei 5° stehen, stellt den pH-Wert auf 8,0 mit 1N NaOH ein, hydrolysiert das restliche β -Propiolacton und führt die Hydrolyse bei Zimmertemperatur im pH-Staten bei pH 8,0 während 2 Stdn. durch.

¹⁾ Degussa, Frankfurt/Main.

Abb. 14
β-Propionyl-lacton-Hydrolaseaktivität im Ausgangsserum und Extrakt

—: Hydrolysekurve des Eluats
---: Hydrolysekurve des Ausgangsserums

Adsorbiertes Serum

Das zu behandelnde adsorbierte Serum wird auf 5° abgekühlt und 0,3 g β-Propionyl-lacton pro 100 ml Serum zugefügt. Man läßt 1 Std. bei 5° stehen, stellt den pH-Wert mit 1N NaOH auf 8,0 ein und führt die Hydrolyse bei Zimmertemperatur im pH-Staten bei pH 8,0 während etwa 8 Std. durch.

Extraktion

α₁-Lipoprotein

Serum wird mit Aerosil adsorbiert, der Niederschlag nach dem Zentrifugieren eingefroren, aufgetaut, nochmals zentrifugiert und mehrmals mit physiol. NaCl-Lösung ausgewaschen. Der Proteingehalt des letzten Waschwassers soll 0,1% nicht übersteigen.

90 g ausgewaschener Aerosil-Niederschlag werden mit 100 ml etwa 15proz. NaCl-Lösung im Mixer zerkleinert. Man stellt den pH-Wert mit 1N NaOH auf 9,0 ein, rührt 1 Stde. bei Zimmertemperatur und stellt dabei den pH-Wert ständig nach. Gesamtverbrauch an 1N NaOH etwa 12–15 ml. Danach zentrifugiert man 20 Min. bei 5000 U./Min. und dialysiert den Überstand (etwa 100 ml) 16 Std. gegen 2 / 0,4proz. NaCl-Lösung.

α₂- und β-Lipoprotein

90 g ausgewaschener und wie oben extrahierter Aerosil-Niederschlag werden 3mal mit 150 ml 10proz. NaCl-Lösung bei pH 9,0 ausgewaschen. Der Proteingehalt der letzten Waschflüssigkeit soll 0,2% nicht übersteigen. Den Niederschlag vermischt man im Mixer mit 100 ml Wasser, fügt 45 g festes NaCl zu, stellt den pH-Wert mit 1N NaOH auf 9,0 ein, rührt 1 Std. bei Zimmertemperatur und stellt den pH-Wert ständig nach. Danach zentrifugiert man 30 Min. bei 5000 U./Min. und dialysiert den Überstand (etwa 100 ml) 16 Std. gegen 5 / 0,3proz. NaCl-Lösung und zur Ankonzentrierung 48 Std. gegen 10% Poly-vinylpyrrolidon K 90.

„β-Propionyl-lacton-Hydrolase-Aktivität“

Der Aerosil-Niederschlag wird mit physiol. NaCl-Lösung proteinfrei gewaschen, 90 g des ausgewaschenen Niederschlages werden mit 75 ml gesättigter NaCl-Lösung + 25 ml Wasser im Mixer zerkleinert. Man stellt den pH-Wert mit 1N NaOH auf 9,0 ein. Danach rührt man 1 Std. bei Zimmertemperatur und stellt den pH-Wert ständig nach. Gesamtverbrauch an 1N NaOH etwa 18–20 ml. Man zentrifugiert 20 Min. bei 5000 U./Min. und

dialysiert den Überstand (etwa 100 ml) 16 Std. gegen 5 / 0,5proz. NaCl-Lösung. Das Produkt kann anschließend lyophilisiert werden.

Durchführung der Sephadex-Gelfiltration

Eine Sephadex-Säule (1 m lang, Durchmesser 5 cm) wird mit Sephadex G 150 in 0,1M Phosphatpuffer, pH 8,0, beschickt. Elution mit 0,1M Phosphatpuffer pH 8,0.

a) Auftrennung eines Serums bzw. adsorbierten Serums:

Aufgetragen werden 10 ml Vollserum (Protein 7,5%), Tropfgeschwindigkeit 15–20 ml/Std.

b) Auftrennung eines Eluates:

Aufgetragen werden 10 ml einer Lösung von 1–2% Protein, Tropfgeschwindigkeit 15 ml/Std.

Die Transmissionen werden im UVICORD (LKB Stockholm) bei 254 nm gemessen.

Prüfung auf chronische Verträglichkeit

Das Präparat wird täglich 4 Wochen lang in einer Dosis von 40 ml/kg i.v. Ratten injiziert. Insgesamt erhält jede Ratte 20 Injektionen mit zusammen 800 ml/kg. Ausgangsgewicht der Ratte ist etwa 80–100 g (nicht höher als 120 g).

Täglich wird das Gewicht kontrolliert, 1mal wöchentlich ein Differentialblutbild angefertigt sowie Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit und Leukocytenzahl bestimmt. Bei Versuchsende wird eine Nierenfunktionsprüfung (Phenolrotausscheidung) durchgeführt und außerdem ein makroskopischer Sektionsbefund erhoben.

Papierelektrophorese

Barbital-Puffer (Michaelis) pH 8,6.

Auftrennzeit: 15–16 Std. bei 100 Volt; aufgetragen werden je nach Proteinkonzentration 5–12 μl. Bei zu geringer Proteinkonzentration können ggf. 2mal 10 μl aufgetragen werden. Anfärbung mit Amidoschwarz.

Immunelektrophorese

Es wurden folgende Antiseren verwendet:

Antihumanserum vom Kaninchen (Behringwerke, Marburg), Anti-Lipoproteinserum vom Kaninchen (Behringwerke, Marburg), Antihumanserum vom Pferd (BIOTEST-Serum-Institut Frankfurt). Die Menge an Antiserum betrug zwischen 0,02 ml und 0,04 ml.

Ouchterlony-Test

Bei der Untersuchung der Eluate (2,3% Protein) auf α₁-Lipoproteide wurde das Antigen 1:20 verdünnt. Bei der Prüfung auf α₂- und β-Lipoproteide wurden die einzelnen Eluate unverdünnt verwendet. Als Antiseren wurden die unverdünnten Antilipoproteinseren vom Kaninchen der Behringwerke benutzt.

Stabilitätstest

100 ml der zu untersuchenden Seren werden nach Sterilfiltration 4 Wochen wechselweise bei 45° und 5° im Turnus von 48 Std. gelagert.

Der sich bildende Niederschlag wird abzentrifugiert und 3mal mit physiol. NaCl-Lösung sowie 2mal mit dest. Wasser gewaschen. Danach wird im Vakuum über P₂O₅ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Frl. E. HAUG danken wir für die technische Durchführung der Versuche, Frl. G. SCHULTE für die tierexperimentellen Prüfungen.

Literatur

1. CLAUSEN, J., A. HANSEN und R. JENSEN, Protides of the Biological Fluids; 9th Coll. Brugge 1961. — 2. WAGNER, E. und H. BRUNNER, Angew. Chem. 72, 744 (1960). — 3. SCHEIDEGGER, J. J., Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955). — 4. LINDGREN, F. T. und A. V.

NICHOLS in F. W. PUTNAM (Ed.), The Plasma Proteins Vol. II, S. 1, Academic Press New York (1960). — 5. LO GRIPPO, G. A., Ann. N. Y. Acad. Sc. 83, 578 (1960). — 6. OUCHTERLONY, Ö., Progr. Allergy 6, 30 (1962).

Dr. W. Stephan

6000 Frankfurt/M.-Niederrad
Flughafenstr. 4